

(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  
2014年9月25日(25.09.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/148455 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07J 63/00 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)  
A61K 31/56 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)  
A61K 31/58 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)  
A61P 1/16 (2006.01) A61P 27/06 (2006.01)  
A61P 9/10 (2006.01) A61P 27/12 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01) A61P 27/14 (2006.01)  
A61P 11/06 (2006.01) C12N 1/14 (2006.01)  
A61P 13/02 (2006.01) C12P 33/00 (2006.01)  
A61P 13/12 (2006.01) C12P 33/06 (2006.01)  
A61P 21/00 (2006.01) C12R 1/645 (2006.01)  
A61P 25/14 (2006.01) C12R 1/785 (2006.01)

- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/057222
- (22) 国際出願日: 2014年3月18日(18.03.2014)
- (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 2013-055887 2013年3月19日(19.03.2013) JP

(71) 出願人: 第一三共株式会社 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 小森谷 聡 (KOMORIYA, Satoshi); 〒1408710 東京都品川区広町1丁目2番58号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 中神 康裕 (NAKAGAMI, Yasuhiro); 〒1408710 東京都品川区広町1丁目2番58号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 波田野 恵美子 (HATANO, Emiko); 〒1408710 東京都品川区広町1丁目2番58号 第一三共

株式会社内 Tokyo (JP). 大貴 貴史 (OHNUKI, Takashi); 〒1348630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一三共RDノバーレ株式会社内 Tokyo (JP). 増田 華代子 (MASUDA, Kayoko); 〒1348630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一三共RDノバーレ株式会社内 Tokyo (JP). 飯塚 真由美 (IIZUKA, Mayumi); 〒1348630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一三共RDノバーレ株式会社内 Tokyo (JP). 小野 泰典 (ONO, Yasunori); 〒1348630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一三共RDノバーレ株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 石橋 公樹, 外 (ISHIBASHI Koki et al.); 〒1400005 東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).

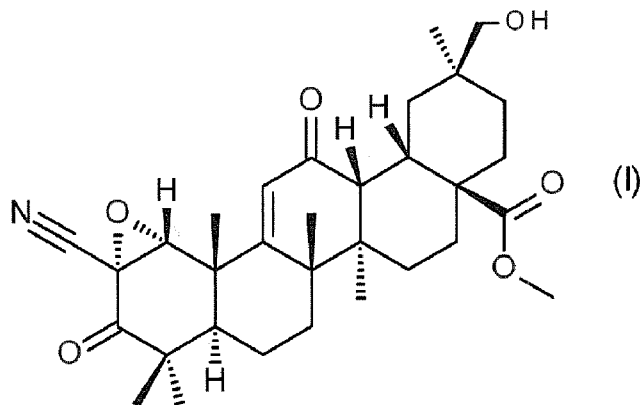
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: TERPENOID DERIVATIVE

(54) 発明の名称: テルペノイド誘導体



(57) Abstract: Provided is a novel terpenoid derivative which exhibits anti-inflammatory action and cytoprotective action by activating Keap1/Nrf2/ARE signal transduction pathways. Terpenoid derivative A is represented by formula (1).

(57) 要約: Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路を活性化することにより、抗炎症作用や細胞保護作用を示す新規なテルペノイド誘導体の提供。下記式(I): で表されるテルペノイド誘導体A。

WO 2014/148455 A1

(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))

## 明 細 書

発明の名称：テルペノイド誘導体

### 技術分野

[0001] 本発明は、Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路の活性化能を有し、抗炎症作用、細胞保護作用に優れるテルペノイド誘導体に関する。

### 背景技術

[0002] エネルギー代謝の過程で生成する活性酸素種などが感知されると、抗酸化酵素群や解毒代謝酵素群など生体防御のシステムが発動する。Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路は、この生体防御のシステムの発動を制御している。

Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路を活性化すると、その標的遺伝子であるNAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 (NQO1)、heme oxygenase-1 (HO-1)、 $\gamma$ -glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)等が誘導されることが知られている(非特許文献1)。NQO1は異物代謝系第2相の酵素であり、解毒作用に重要である。HO-1およびGCLCは典型的な抗酸化酵素として知られている。これらの酵素量が増加あるいは活性化されると、細胞は毒物、酸化ストレス、炎症等に対して耐性となるため、このシグナル伝達経路を活性化する化合物は様々な疾患に対する治療薬になると考えられている(非特許文献2-5)。対象となる具体的な疾患の例は、以下に示す通りである。

Nrf2欠損マウスは、網膜虚血再灌流系で脆弱性を示すことが報告されている(非特許文献6)。そのため、眼疾患として、アレルギー性結膜疾患、ウィルス性結膜炎、翼状片、角膜感染症、角膜内皮障害、白内障、ぶどう膜炎、ベーチェット病、糖尿病網膜症、網膜剥離、網膜静脈閉塞、中心性漿液性脈絡網膜症、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑浮腫、黄斑疾患、網膜色素変性、緑内障、白内障などへの適応が示唆されている(非特許文献7、8)。

Nrf2欠損マウスは、シスプラチン誘発腎毒性に脆弱性を示すことが報告されている（非特許文献9）。そのため、腎疾患として、急性腎炎、慢性腎炎、急性腎不全、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、IgA腎症、糖尿病腎症、痛風腎、腎硬化症、水腎症、尿細管間質性腎炎、腎尿路感染症などへの適応が示唆されている（非特許文献10）。

Nrf2欠損マウスは、タバコ煙曝露に対して脆弱性を示すことが報告されている（非特許文献11）。そのため、呼吸器疾患として、気管支炎、肺炎、胸膜炎、慢性閉塞性肺疾患、びまん性汎細気管支炎、肺気腫、喘息などへの適応が示唆されている。（非特許文献12、13）。

Nrf2欠損マウスは、メチオニン・コリン欠乏食給餌で非アルコール性脂肪性肝炎になりやすいことが報告されている（非特許文献14）。そのため、肝疾患として、アルコール性脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症、肝硬変などへの適応が示唆される（非特許文献2、15）。

また、Nrf2活性化剤は、マウスで血糖低下作用を示すことが報告されており（非特許文献16）、そのため、糖尿病およびその合併症（糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害）などへの適応が示唆される。

Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路を活性化する物質として、ブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラフェンやカレーのターメリックに含まれるクルクミンなどが、Nrf2を活性化し、発ガン物質の解毒化を促進することが報告されている（非特許文献17）。また、Hondaらによって発見されたメチル 2-シアノ-3,12-ジオキソオレアン-1,9(11)-ジエン-28-酸を含む5員環のトリテルペノイド（非特許文献18及び特許文献1-9）は、Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路を活性化することが報告されており、それらの化合物では数種の抗炎症性タンパク質および抗酸化タンパク質（たとえばNQO1、HO-1、GCLC）の産生をもたらすことが報告されている（特許文献9）。

**先行技術文献**

**特許文献**

[0003] 特許文献1 : WO 9 9 6 5 4 7 8

特許文献2 : WO 2 0 1 2 1 2 5 4 8 8

特許文献3 : WO 2 0 1 1 1 3 0 3 0 2

特許文献4 : WO 2 0 0 9 1 4 6 2 1 6

特許文献5 : WO 2 0 0 9 1 2 9 5 4 6

特許文献6 : WO 2 0 0 9 1 2 9 5 4 8

特許文献7 : WO 2 0 0 9 0 2 3 2 3 2

特許文献8 : WO 2 0 0 4 0 6 4 7 2 3

特許文献9 : WO 2 0 0 9 0 8 9 5 4 5

### 非特許文献

[0004] 非特許文献1 : Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2012 ; 44 : 1315-1320

非特許文献2 : Clin. Pharmacol. Ther. 2012 ; 92 : 340-348

非特許文献3 : Adv. Pharmacol. 2012 ; 63 : 43-79

非特許文献4 : Med. Res. Rev. 2012 ; 32 : 687-726

非特許文献5 : Mol. Aspects. Med. 2011 ; 32 : 234-246

非特許文献6 : Free Radic Biol. Med. 2011 ; 51 : 216-224

非特許文献7 : Front Biosci. (Elite Ed.) 2012 ; 4 : 141-115

非特許文献8 : Curr. Med. Chem. 2011 ; 18 : 931-942

非特許文献9 : J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010 ; 335 : 2-12

非特許文献10 : Int. J. Nephrol. 2012 ; 321714

非特許文献11 : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009 ; 1

06 : 250 - 255

非特許文献12 : Trends Mol. Med. 2011 ; 17 : 363 - 371

非特許文献13 : Toxicol. Appl. Pharmacol. 2010 ; 244 : 43 - 56

非特許文献14 : Free Radic Biol. Med. 2010 ; 48 : 357 - 371

非特許文献15 : J. Nutr. Biochem. 2012 ; 23 : 1201 - 1206

非特許文献16 : J. Biol. Chem. 2010 ; 285 : 40581 - 40592

非特許文献17 : 生化学 2009 ; 81 : 447 - 9

非特許文献18 : Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998 : 8 : 2711 - 2714

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

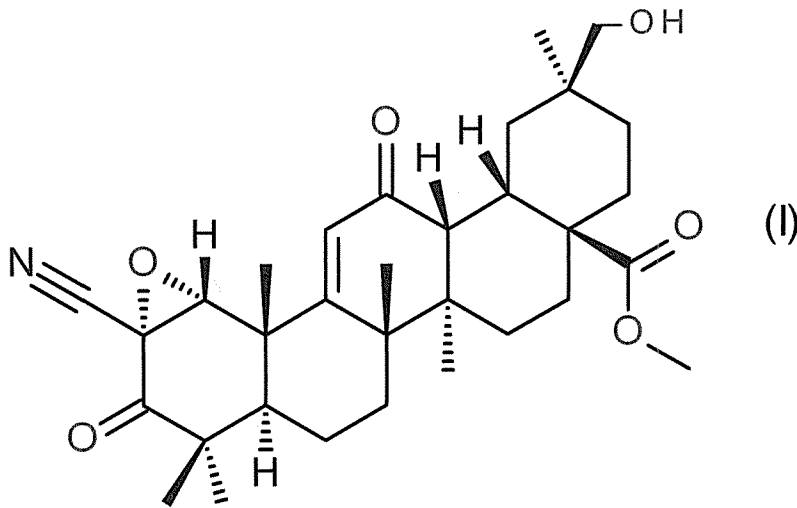
[0005] 本発明者らは、Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路を活性化  
する化合物について鋭意研究を行なった結果、特定のテルペノイド誘導体が  
、優れた抗炎症作用、細胞保護作用を有することを見出し、本発明を完成し  
た。

### 課題を解決するための手段

[0006] すなわち本発明は、  
(1) 下記式(1) :

[0007]

[化1]



で表されるテルペノイド誘導体、

[0008] (2) 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{32}H_{43}NO_6$

3) 分子量：537 (ESIマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである、

実測値：538.31549

計算値：538.31631

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル(500 MHz)は、以下に示す通りである、

$\sigma$ : 0.92 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.12 (3H, s), 1.14-1.17 (1H, m), 1.19 (3H, s), 1.22-1.24 (1H, m), 1.18-1.25 (1H, m), 1.28 (3H, s), 1.28 (3H, s), 1.46-1.48 (1H, m), 1.48-1.52 (1H, m), 1.50-1.54 (1H, m), 1.59-1.67 (2H, m), 1.62-1.66 (1H, m), 1.64-1.6

7 (1H, m), 1.75 (1H, d, J=13.5 Hz), 1.80–1.83 (1H, m), 1.85–1.87 (2H, m), 1.98 (1H, dd, J=9.0 Hz, 4.5 Hz), 2.95 (1H, s), 2.98 (1H, brs), 3.45 (1H, d, J=11.5 Hz), 3.70 (3H, s), 3.73 (1H, d, J=11.5 Hz), 4.34 (1H, s), 6.11 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである、

$\sigma$ : 18.5 (t), 21.1 (q), 21.6 (q), 23.0 (q), 24.0 (q), 24.1 (t), 27.3 (q), 28.2 (q), 28.6 (t), 29.6 (t), 31.0 (d), 31.5 (t), 31.6 (t), 32.4 (t), 35.7 (s), 41.2 (s), 42.3 (s), 42.8 (d), 45.3 (s), 45.8 (s), 47.1 (s), 49.6 (d), 52.3 (q), 53.5 (s), 67.6 (t), 69.3 (d), 113.7 (s), 124.8 (d), 169.8 (s), 178.0 (s), 199.6 (s), 202.5 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト (株) 製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=45/55 のアイソクラティック

流 速：1.0 ml/分

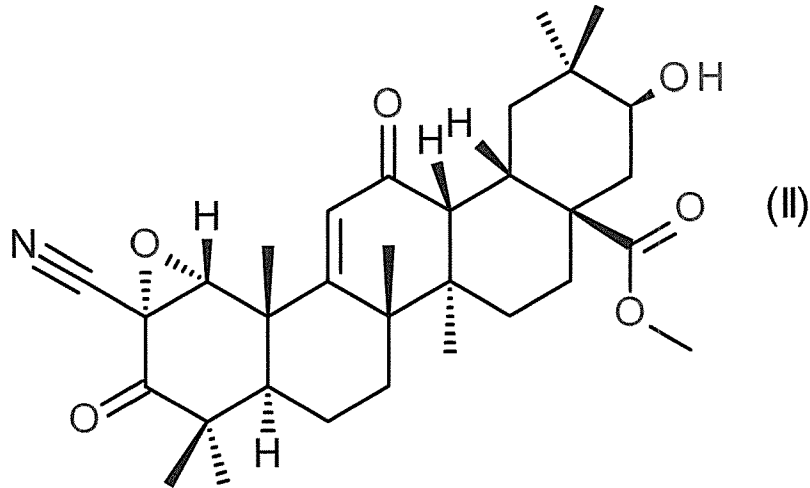
温 度：40°C

検 出：紫外部吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：5.8分、

[0009] (3) 下記式 (11)

[0010] [化2]



で表されるテルペノイド誘導体、

[0011] (4) 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{32}H_{43}NO_6$

3) 分子量：537 (ESIマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである、

実測値：538.31573

計算値：538.31631

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.99 (3H, s), 0.99 (3H, s), 1.06 (3H, s),  
 1.12 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.19-1.22 (1H, m),  
 1.27 (3H, s), 1.27 (3H, s), 1.29-1.35 (2H, m),  
 1.45-1.49 (1H, m), 1.62-1.66 (1H, m),  
 1.58-1.67 (2H, m), 1.64-1.69 (1H, m),  
 1.72-1.75 (1H, m), 1.69-1.79 (1H, m),  
 1.88 (2H, dd,  $J=10.0\text{Hz}, 3.0\text{Hz}$ ), 1.96

(1H, dd, J=10.0Hz, 4.5Hz), 2.97 (1H, s),  
3.04 (1H, dd, J=10.0Hz, 4.5Hz), 3.49 (1H,  
dd, J=11.5Hz, 5.0Hz), 3.70 (3H, s), 4.3  
4 (1H, s), 6.08 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを  
0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125MHz  
)は、以下に示す通りである、

$\sigma$ : 16.6 (q), 18.5 (t), 21.6 (q $\times$ 2), 23.0 (q  
) , 24.0 (q), 24.1 (t), 28.2 (q), 28.4 (t),  
29.3 (q), 31.3 (d), 31.6 (d), 36.1 (t), 36  
. 2 (s), 40.4 (t), 41.1 (s), 42.2 (s), 42.8  
(d), 45.3 (s), 45.8 (s), 49.1 (s), 49.3 (d  
) , 52.3 (s), 53.4 (s), 69.2 (d), 73.9 (t),  
113.7 (s), 125.0 (d), 168.9 (s), 176.8 (s),  
198.9 (s), 202.5 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6mm $\times$ 長さ75mm：インタクト(株)製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸含有10mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=45/55のアイソクラティック

流 速：1.0ml/分

温 度：40 $^{\circ}\text{C}$

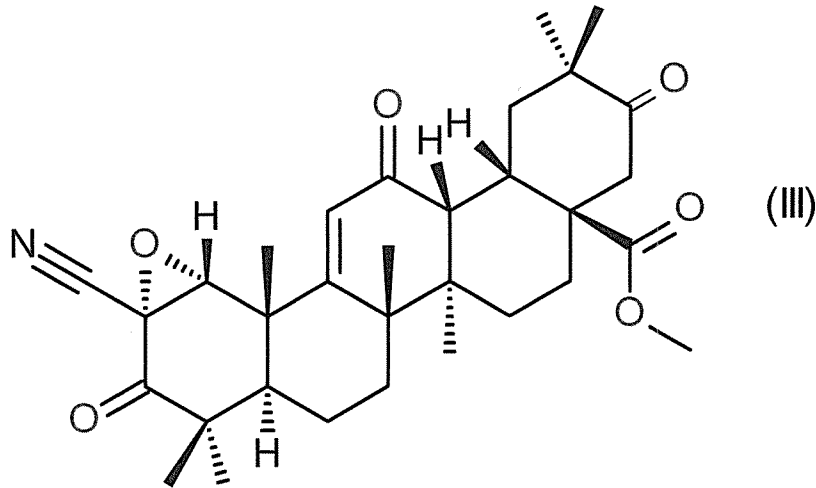
検 出：紫外部吸収  $\lambda$ 230nm

保持時間：3.8分、

[0012] (5) 下記式(111)

[0013]

[化3]



で表されるテルペノイド誘導体、

[0014] (6) 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{32}H_{41}NO_6$

3) 分子量：535 (ESIマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである、

実測値：536.30023

計算値：536.30066

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 1.04 (3H, s), 1.05 (3H, s), 1.13 (3H, s),  
 1.19 (3H, s), 1.20-1.26 (1H, m), 1.30 (m,  
 3H), 1.29 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1.47-1.  
 50 (1H, m), 1.63-1.68 (2H, m), 1.59-1.68  
 (2H, m), 1.65-1.67 (1H, m), 1.64-1.73 (2  
 H, m), 1.71 (1H, d,  $J=13.5$ Hz), 1.98 (1H, d

, J = 13.5 Hz), 2.03 (1H, dd, J = 14.0 Hz, 3.5 Hz), 2.27 (1H, d, J = 14.5 Hz), 2.85 (1H, d, J = 14.5 Hz), 3.05 (1H, d, J = 4.5 Hz), 3.38 (1H, brd, J = 13.5 Hz), 3.74 (3H, s), 4.34 (1H, s), 6.12 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである、

$\sigma$ : 18.4 (t), 21.6 (q $\times$ 2), 23.0 (q), 24.1 (q $\times$ 2), 25.5 (q), 25.6 (t), 28.2 (q), 28.3 (t), 31.5 (t), 31.7 (d), 37.4 (t), 41.2 (s), 42.1 (s), 42.8 (d), 45.3 (s), 45.6 (s), 45.9 (s), 47.0 (t), 49.1 (d), 51.1 (s), 52.7 (q), 53.4 (s), 69.2 (d), 113.7 (s), 124.8 (d), 169.4 (s), 175.5 (s), 198.5 (s), 202.4 (s), 213.4 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6 mm $\times$ 長さ75 mm: インタクト (株) 製)

溶 媒: A: 0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B = 45/55 のアイソクラティック

流 速: 1.0 ml/分

温 度: 40 $^{\circ}\text{C}$

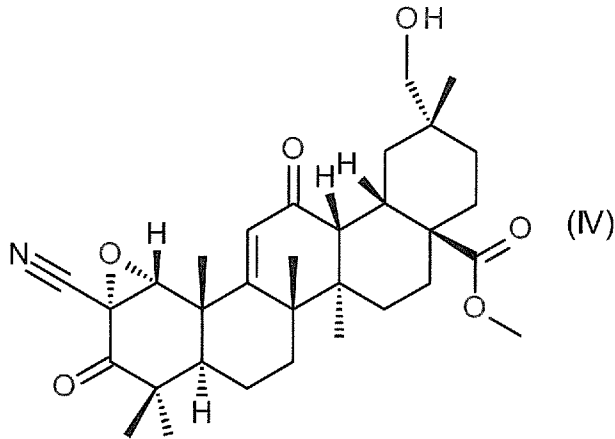
検 出: 紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間: 6.2分、

[0015] (7) 下記式 (I V) :

[0016]

[化4]



で表されるテルペノイド誘導体、

[0017] (8) 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{32}H_{43}NO_6$

3) 分子量：537 (ESIマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである、

実測値：538.31592

計算値：538.31631

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 1.05 (3H, s), 1.11 (3H, s), 1.15 (3H, s),  
 1.22 (3H, s), 1.25-1.27 (1H, m), 1.27-1.29 (1H, m), 1.30 (3H, s), 1.30 (3H, s), 1.40 (1H, brt,  $J=13.0$  Hz), 1.48-1.52 (1H, m), 1.50-1.54 (1H, m), 1.58-1.60 (1H, m), 1.60-1.63 (1H, m), 1.62-1.71 (2H, m), 1.66-1.70 (1H, m), 1.69-1.73 (1H, m), 1.76

-1.82 (1H, m), 1.90-1.94 (1H, m), 1.93-1.99 (1H, m), 2.01 (1H, dd,  $J=4.5$  Hz, 10.0 Hz), 3.02 (1H, d,  $J=4.5$  Hz), 3.12 (1H, dt,  $J=3.5$  Hz, 13.5 Hz), 3.32 (3H, s), 3.74 (3H, s), 4.36 (1H, s), 6.11 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである、

$\sigma$ : 18.3 (t), 18.7 (q), 21.4 (q), 21.5 (q), 22.7 (t), 22.8 (q), 23.9 (q), 28.0 (q), 28.2 (t), 28.7 (t), 30.1 (t), 30.8 (d), 31.4 (t), 32.0 (t), 35.8 (s), 40.9 (s), 42.0 (s), 42.5 (d), 45.1 (s), 45.6 (s), 47.4 (s), 49.6 (d), 52.0 (q), 53.2 (s), 69.1 (d), 74.2 (t), 113.6 (s), 124.8 (d), 168.7 (s), 178.0 (s), 198.7 (s), 202.4 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト (株) 製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速：1.0 ml/分

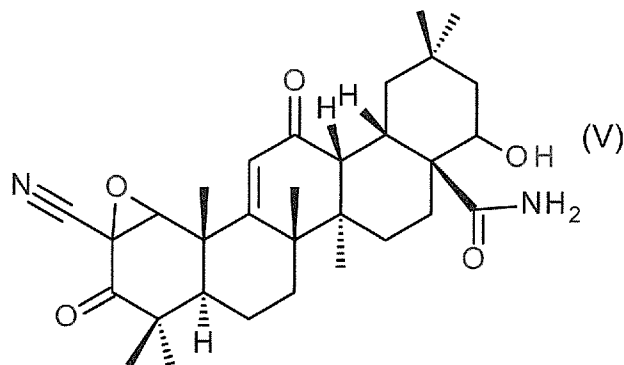
温 度：40°C

検 出：紫外部吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：5.2分、

[0018] (9) 下記式 (V)：

[0019] [化5]



で表されるテルペノイド誘導体、

[0020] (10) 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{31}H_{42}N_2O_5$

3) 分子量：522 (ESIマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである、

実測値：523.31616

計算値：523.31665

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.95 (3H, s), 1.03 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.26-1.30 (1H, m), 1.28-1.30 (1H, m), 1.28 (3H, s), 1.34 (3H, s), 1.35 (1H, t,  $J=12.5$  Hz), 1.48-1.52 (1H, m), 1.57-1.60 (1H, m), 1.60-1.68 (2H, m), 1.64-1.68 (1H, m), 1.65-1.69 (1H, m), 1.72-1.74 (1H, m), 1.79-1.81 (1H, m), 1.97-1.99 (1H, m), 1.98-2.00 (1H, m), 2.92 (1H, brd,  $J=13.0$  Hz), 3.42 (1H, d

,  $J=4.0$  Hz), 3.90 (1H, brd,  $J=10.0$  Hz),  
4.34 (1H, s), 6.08 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを  
0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz  
) は、以下に示す通りである、

$\sigma$ : 17.4 (t), 18.3 (t), 21.4 (q), 21.5 (q),  
22.8 (q), 24.0 (q), 24.2 (q), 27.7 (t), 28  
.0 (q), 31.1. (s), 31.4 (t), 31.8 (d), 33.  
2 (q), 35.6 (t), 40.9 (s), 42.58 (d), 42.6  
2 (s), 43.8 (t), 45.1 (s), 45.8 (s), 49.2 (d),  
51.6 (s), 53.3 (s), 69.1 (d), 71.0 (d)  
, 113.6 (s), 124.8 (d), 168.7 (s), 178.7 (s),  
198.8 (s), 202.3 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm: インタクト (株) 製)

溶 媒: A: 0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジ  
エント

流 速: 1.0 ml/分

温 度: 40°C

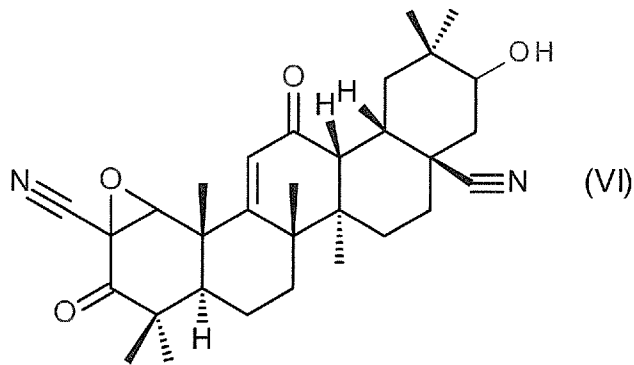
検 出: 紫外外部吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間: 3.2分、

[0021] (11) 下記式 (V1):

[0022]

[化6]



で表されるテルペノイド誘導体、

[0023] (12) 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{31}H_{40}N_2O_4$

3) 分子量：504 (ESIマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである、

実測値：505.30551

計算値：505.30608

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.998 (3H, s), 1.001 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.14 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.30 (1H, t,  $J=13.5$  Hz), 1.32 (3H, s), 1.36 (1H, dt,  $J=3.5$  Hz, 12.5 Hz), 1.50 (3H, s), 1.54-1.58 (1H, m), 1.64-1.69 (1H, m), 1.68-1.70 (2H, m), 1.70-1.73 (1H, m), 1.74 (1H, dd,  $J=3.5$  Hz, 13.5 Hz), 1.97-2.01 (1H, m), 2.00-2.03 (1H, m), 1.99-2.11 (2H, m), 2.07 (1H, brt,  $J=13.5$  Hz), 2.80 (1H, dt,  $J=3.5$  Hz)

z, 13.5 Hz), 3.26 (1H, d, J=5.0 Hz), 3.45 (1H, dd, J=5.0 Hz, 12.0 Hz), 4.34 (1H, s), 6.14 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである、

$\sigma$ : 16.3 (q), 18.2 (t), 21.36 (q), 21.38 (q), 22.8 (q), 24.3 (q), 25.1 (t), 28.0 (q), 28.3 (t), 29.0 (q), 31.4 (t), 33.7 (d), 35.0 (t), 35.9 (s), 39.5 (t), 39.7 (s), 41.0 (s), 42.1 (s), 42.5 (d), 45.1 (s), 45.8 (s), 49.3 (d), 53.2 (s), 68.9 (d), 72.4 (d), 113.5 (s), 123.5 (s), 124.5 (d), 169.6 (s), 197.5 (s), 202.1 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト (株) 製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速：1.0 ml/分

温 度：40°C

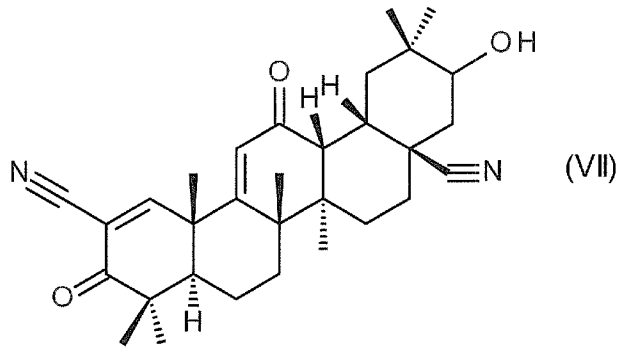
検 出：紫外部吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：4.2分、

[0024] (13) 下記式 (V11)：

[0025]

[化7]



で表されるテルペノイド誘導体、

[0026] (14) 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

1) 物質の性状：無色粉末状物質、

2) 分子式： $C_{31}H_{40}N_2O_3$

3) 分子量：488 (ESIマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである、

実測値：489.31073

計算値：489.31117

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.996 (3H, s), 0.997 (3H, s), 0.998 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.27 (3H, s), 1.28 (1H, t,  $J=14.0$ Hz), 1.36 (1H, dt,  $J=2.5$ Hz, 13.0Hz), 1.53 (3H, s), 1.56 (3H, s), 1.60-1.64 (1H, m), 1.63-1.69 (1H, m), 1.70-1.74 (1H, m), 1.71 (1H, dd,  $J=3.5$ Hz, 14.0Hz), 1.78 (1H, dd,  $J=3.0$ Hz, 11.0Hz), 1.82-1.86 (2H, m), 1.99-2.02 (1H, m), 1.99-2.10 (2H, m), 2.08 (1H, brt,  $J=12.0$ Hz), 2.79 (

1 H, d t, J = 3. 5 Hz, 13. 5 Hz), 3. 25 (1 H, d, J = 5. 0 Hz), 3. 45 (1 H, d d, J = 5. 0 Hz, 11. 5 Hz), 6. 02 (1 H, s), 8. 03 (1 H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0. 00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである、

$\sigma$  : 16. 3 (q), 18. 2 (t), 21. 4 (q), 21. 5 (q), 24. 9 (q), 25. 1 (t), 26. 7 (q), 27. 0 (q), 28. 1 (t), 29. 0 (q), 31. 7 (t), 33. 6 (d), 34. 9 (t), 35. 9 (s), 39. 5 (t), 39. 6 (s), 42. 1 (s), 42. 6 (s), 45. 0 (s), 45. 9 (s), 47. 8 (d), 49. 3 (d), 72. 4 (d), 114. 3 (s), 114. 7 (s), 123. 5 (s), 123. 7 (d), 165. 2 (d), 169. 4 (s), 196. 3 (s), 197. 6 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4. 6 mm×長さ75 mm：インタクト (株) 製)

溶 媒：A：0. 01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0. 01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B = 5/5で平衡化したのちA/B = 1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速：1. 0 ml/分

温 度：40°C

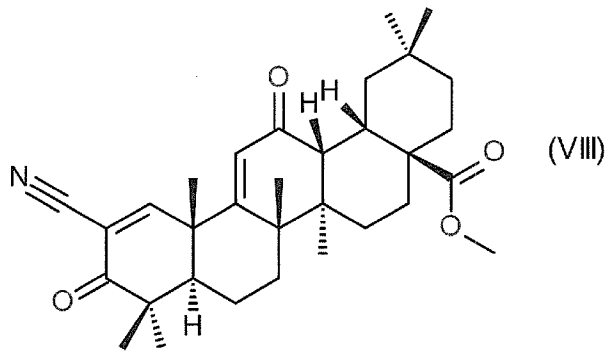
検 出：紫外部吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：3. 7分、

[0027] (15) 下記式 (V I I I) :

[0028]

[化8]

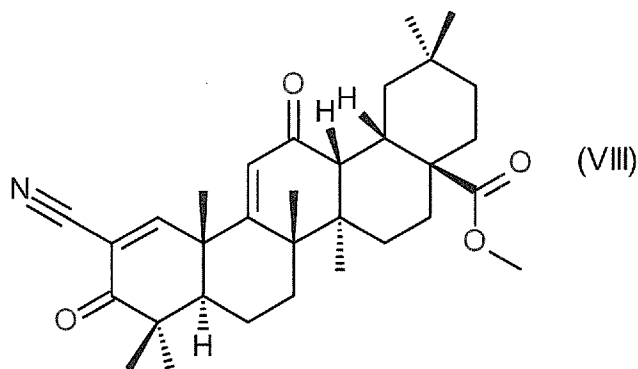


で表される化合物を基質とし、このものを上記（１）、（２）、（７）乃至（８）のいずれか１項に記載の化合物に変換しうるカニングハメラ属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より上記（１）、（２）、（７）乃至（８）のいずれか１項に記載の化合物を採取することを特徴とする、上記（１）、（２）、（７）乃至（８）のいずれか１項に記載の化合物の製造方法、

[0029] （１６） 変換菌が、カニングハメラ属に属するカニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*) SANK 10412株（受託番号NITE BP-1487）である、上記（１５）に記載の化合物の製造方法、

[0030] （１７） 下記式（VIII）：

[0031] [化9]



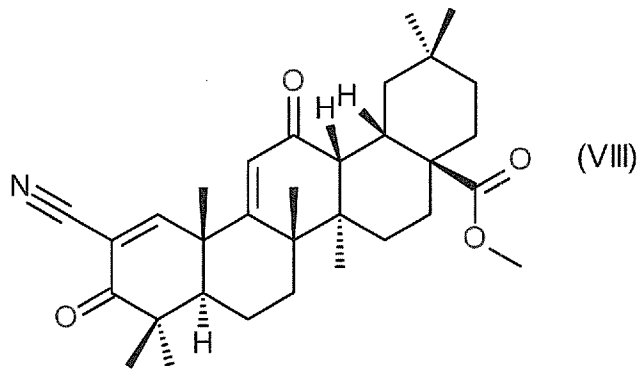
で表される化合物を基質とし、このものを上記（３）乃至（６）のいずれか１項に記載の化合物に変換しうるケトミウム属に属する変換菌と共に培地中

で培養し、その培養物より上記（3）乃至（6）のいずれか1項に記載の化合物を採取することを特徴とする、上記（3）乃至（6）のいずれか1項に記載の化合物の製造方法、

[0032] （18） 変換菌がケトミウム属に属するケトミウム・グロボーサム (*Chaetomium globosum*) SANK 10312株(受託番号 NITE BP-1486)である、上記（19）に記載の製造方法、

[0033] （19） 下記式（VIII）：

[0034] [化10]



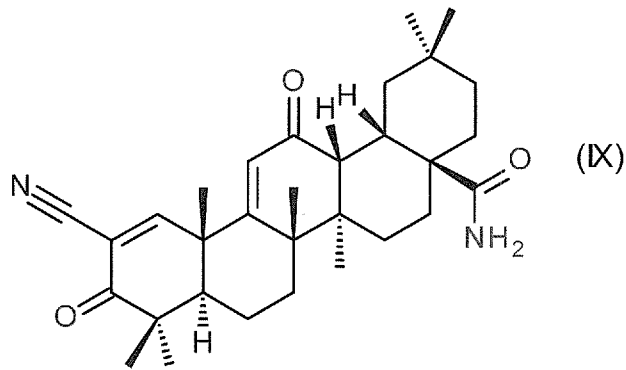
で表される化合物を基質とし、このものを上記（3）乃至（6）のいずれか1項に記載の化合物に変換しうるムコール属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より上記（3）乃至（6）のいずれか1項に記載の化合物を採取することを特徴とする、上記（3）乃至（6）のいずれか1項に記載の化合物の製造方法、

[0035] （20） 変換菌が、ムコール属に属するムコール・ヒエマリス・エフ・ヒエマリス (*Mucor hiemalis* f. *hiemalis*) SANK 10612株(受託番号 NITE BP-1488)である、上記（21）に記載の製造方法、

[0036] （21） 下記式（IX）：

[0037]

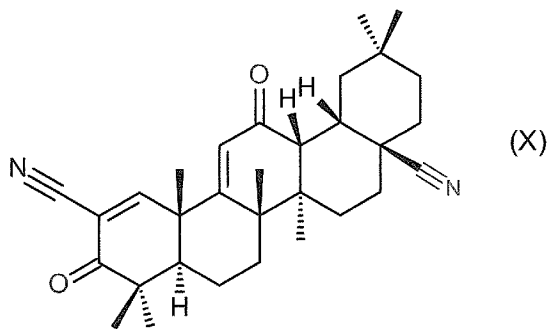
[化11]



で表される化合物を基質とし、このものを上記（9）又は（10）に記載の化合物に変換しうるケトミウム属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より上記（9）又は（10）に記載の化合物を採取することを特徴とする、上記（9）又は（10）に記載の化合物の製造方法、

[0038] (22) 下記式 (X) :

[0039] [化12]



で表される化合物を基質とし、このものを上記（11）乃至（14）のいずれか1項に記載の化合物に変換しうるケトミウム属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より上記（11）乃至（14）のいずれか1項に記載の化合物を採取することを特徴とする、上記（11）乃至（14）のいずれか1項に記載の化合物の製造方法、

[0040] (23) カニングハメラ属に属するカニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*) SANK 10412株 (受託番号NITE BP-1487)、

(24) ケトミウム属に属するケトミウム・グロボーサム (*Chaetomium globosum*) SANK 10312株(受託番号NITE BP-1486)、

(25) ムコール属に属するムコール・ヒエマリス・エフ・ヒエマリス (*Mucor hiemalis f. hiemalis*) SANK 10612株(受託番号NITE BP-1488)、

[0041] (26) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する医薬、

(27) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する

眼疾患(当該眼疾患は、アレルギー性結膜疾患、ウィルス性結膜炎、翼状片、角膜感染症、ドライアイ、角膜障害(角膜上皮障害、及び/又は、角膜内皮障害である)、ぶどう膜炎、ベーチェット病、糖尿病網膜症、網膜剥離、網膜静脈閉塞、中心性漿液性脈絡網膜症、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑浮腫、黄斑疾患、網膜色素変性、緑内障、若しくは、白内障である)、

腎疾患(当該腎疾患は、急性腎炎、慢性腎炎、急性腎不全、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、IgA腎症、糖尿病腎症、痛風腎、腎硬化症、水腎症、尿細管間質性腎炎、冠動脈バイパス手術後の腎機能低下、若しくは、腎尿路感染症である)、

呼吸器疾患(当該呼吸器疾患は、気管支炎、肺炎、胸膜炎、慢性閉塞性肺疾患、急性肺障害(*acute lung injury: ALI*)、びまん性汎細気管支炎、肺気腫、若しくは、喘息である)、

肝疾患(当該肝疾患は、アルコール性脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症、肝硬変若しくは肝移植に伴う肝機能障害である)、

脳疾患(当該脳疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(*amyotrophic lateral sclerosis: ALS*)、脳梗塞、若しくは、多発性硬化症(*multiple sclerosis*)である)、若しくは

心臓疾患（当該心臓疾患は、心筋梗塞である）

の予防剤又は治療剤、

[0042] (28) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する

眼疾患（当該眼疾患は、ドライアイ、角膜障害（角膜上皮障害、及び／又は、角膜内皮障害である）、ぶどう膜炎、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑浮腫、若しくは緑内障である）、

腎疾患（当該腎疾患は、糖尿病腎症である）、

呼吸器疾患（当該呼吸器疾患は、慢性閉塞性肺疾患、若しくは、急性肺障害である）、

肝疾患（当該肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変、若しくは、肝移植に伴う肝機能障害である）、若しくは

脳疾患（当該脳疾患は、脳梗塞、若しくは、多発性硬化症である）の予防剤又は治療剤。

[0043] (29) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有するドライアイの予防又は治療剤、

(30) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する角膜上皮、及び／又は、角膜内皮の障害の予防又は治療剤、

(31) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する加齢黄斑変性の予防又は治療剤、

(32) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する糖尿病黄斑浮腫、及び／又は、網膜静脈閉塞の予防又は治療剤、

(33) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤、

(34) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する脳梗塞の予防又は治療剤、及び、

(35) 上記(1)乃至(14)のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する多発性硬化症の予防又は治療剤である。

[0044] 上記(1)に記載の化学構造式で表されるテルペノイド誘導体又は上記(2)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体を、テルペノイド誘導体Aと記載する。

上記(3)に記載の化学構造式で表されるテルペノイド誘導体又は上記(4)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体を、テルペノイド誘導体Bと記載する。

上記(5)に記載の化学構造式で表されるテルペノイド誘導体又は上記(6)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体を、テルペノイド誘導体Cと記載する。

上記(7)に記載の化学構造式で表されるテルペノイド誘導体又は上記(8)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体を、テルペノイド誘導体Dと記載する。

上記(9)に記載の化学構造式で表されるテルペノイド誘導体又は上記(10)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体を、テルペノイド誘導体Eと記載する。

上記(11)に記載の化学構造式で表されるテルペノイド誘導体又は上記(12)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体を、テルペノイド誘導体Fと記載する。

上記(13)に記載の化学構造式で表されるテルペノイド誘導体又は上記(14)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体を、テルペノイド誘導体Gと記載する。

テルペノイド誘導体A乃至Gを、本発明のテルペノイド誘導体とも記す。

[0045] 本発明のテルペノイド誘導体は、溶媒和物になることがある。また、大気中に放置することにより、水分を吸収し、吸着水が付いたり、水和物になっ

たりする場合がある。そのような溶媒和物や水和物も本発明に包含される。

[0046] 本発明のテルペノイド誘導体は、幾何異性体（*c i s*、*t r a n s*異性体）及び分子内の不斉中心に基づく光学異性体等が存在する場合がある。本発明はこれらの異性体およびこれらの異性体の任意の割合の混合物をもすべて含むものである。

### 発明の効果

[0047] 本発明のテルペノイド誘導体は、抗炎症作用、細胞保護作用に優れ、眼疾患、腎疾患、呼吸器疾患、肝疾患、糖尿病およびその合併症などの治療薬として有用である。

### 図面の簡単な説明

[0048] [図1]テルペノイド誘導体Aの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル  
[図2]テルペノイド誘導体Aの $^1\text{H-}^{13}\text{C HSQC}$ スペクトル  
[図3]テルペノイド誘導体Aの $^1\text{H-}^1\text{H NOESY}$ スペクトル  
[図4]テルペノイド誘導体Bの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル  
[図5]テルペノイド誘導体Bの $^1\text{H-}^{13}\text{C HSQC}$ スペクトル  
[図6]テルペノイド誘導体Bの $^1\text{H-}^1\text{H NOESY}$ スペクトル  
[図7]テルペノイド誘導体Cの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル  
[図8]テルペノイド誘導体Cの $^1\text{H-}^{13}\text{C HSQC}$ スペクトル  
[図9]テルペノイド誘導体Cの $^1\text{H-}^1\text{H NOESY}$ スペクトル  
[図10]テルペノイド誘導体Dの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル  
[図11]テルペノイド誘導体Dの $^1\text{H-}^{13}\text{C HSQC}$ スペクトル  
[図12]テルペノイド誘導体Dの $^1\text{H-}^1\text{H NOESY}$ スペクトル

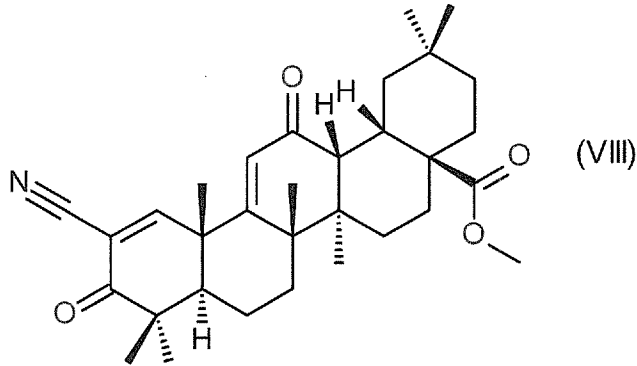
### 発明を実施するための形態

[0049] 本発明のテルペノイド誘導体は、特定の基質化合物を本発明のテルペノイド誘導体に変換する能力のある微生物〔本発明において、変換菌（*strain for transformation*）という〕の培養物から常法に従って単離・精製することが出来る。

[0050] 1. 基質化合物

本発明のテルペノイド誘導体を製造する際の基質として、下記式 (VII I ) により表される化合物を用いることができる。

[化13]

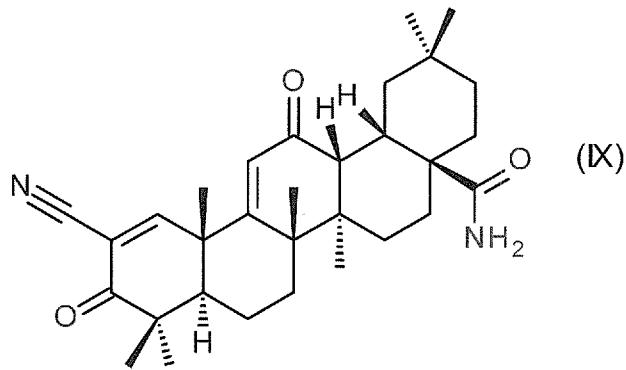


上記化合物は、医薬品一般名をバルドキシロンメチル (Bardoxol one methyl) という。上記化合物は、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 8 (1998) 2711-2714に、合成Scheme 2の中の化合物番号17として記載されており、Methyl 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate (CDDO-Me)とも記される。以下、上記基質化合物を、CDDO-Meとも記す。

CDDO-Meは、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 7 (1997) 1623-1628、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 8 (1998) 2711-2714に記載の合成方法に準じて製造することができる。

[0051] さらに、本発明のテルペノイド誘導体を製造する際の基質として、下記式 (IX) により表される化合物を用いることができる。

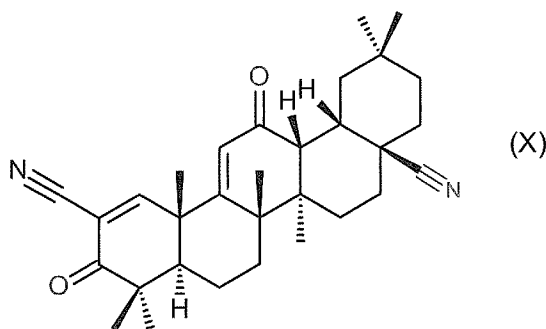
[化14]



上記化合物は、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12 (2002) 1027-1030に、合成Scheme 1の中の化合物番号15として記載されている。上記化合物は、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12 (2002) 1027-1030に記載の合成方法に準じて製造することができる。

[0052] さらに、本発明のテルペノイド誘導体を製造する際の基質として、下記式(X)により表される化合物を用いることができる。

[化15]



上記化合物は、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12 (2002) 1027-1030に、合成Scheme 1の中の化合物番号4として記載されている。上記化合物は、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12 (2002) 1027-1030に記載の合成

方法に準じて製造することができる。

[0053] 2. 基質化合物からの製造

(1) 変換菌

基質化合物から本発明のテルペノイド誘導体A、テルペノイド誘導体Dを製造するために使用する変換菌としては、特に限定されないが、好適には真菌であり、例えば、カニングハメラ (*Cunninghamella*) 属に属する真菌を挙げることができる。

カニングハメラ属に属する真菌としては、好適には、カニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*) であり、より好適には、カニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamzella elegans*) SANK 10412株 (受託番号NITE BP-1487) (以下、「SANK 10412株」という) である。

SANK 10412株は、1993年4月に千葉県 of 土壌より分離された。

[0054] 基質化合物から本発明のテルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体C、テルペノイド誘導体E、テルペノイド誘導体F、テルペノイド誘導体Gを製造するために使用する変換菌としては、特に限定されないが、好適には真菌であり、例えば、ケトミウム (*Chaetomium*) 属に属する真菌やムコール (*Mucor*) 属に属する真菌を挙げることができる。

ケトミウム属に属する真菌としては、好適には、ケトミウム・グロボーサム (*Chaetomium globosum*) であり、より好適には、ケトミウム・グロボーサム SANK 10312株 (受託番号 NITE BP-1486) (以下、「SANK 10312株」という) である。

SANK 10312株は、2000年11月に京都府の淡水から分離された。

[0055] ムコール属に属する真菌として、好適には、ムコール・ヒエマリス・エフ・ヒエマリス (*Mucor hiemalis* f. *hiemalis*) であり、より好適には、ムコール・ヒエマリス・エフ・ヒエマリス (*Muco*

r hiemalis f. hiemalis) SANK 10612株  
(受託番号NITE BP-1488) (以下、「SANK 10612株  
」という)である。

SANK 10612株は、1999年8月に茨城県で採集された試料よ  
り分離された。

[0056] SANK 10312株、SANK 10412株、及びSANK 10  
612株の菌株の同定のために、菌の培養に利用した培地は以下の5種類で  
あり、その組成は以下の通りである。

<PDA培地 ポテト デキストロース寒天 (Potato Dextro  
se Agar) 培地 >

ニッスイ ポテト デキストロース寒天培地 (日水製薬 (株) 製) 39g  
蒸留水 1000ml

<MEA (CBS) 培地 {麦芽エキス寒天 (Malt extract a  
gar) (CBS) 培地} 培地 >

バクト マルトエキストラクト (Becton, Dickinson a  
nd Company 製)  
20g

寒天 15g  
蒸留水 1000ml

<OA培地 {オートミール寒天 (Oatmeal agar) 培地} >

オートミール抽出液\* 1000ml  
寒天 20g

\*30gのオートミールに蒸留水を加えて2時間ほど煮出し、布でろ過して  
1000mlにフィルアップし作成した。

<MEA培地 {麦芽エキス寒天 (Malt extract agar) 培  
地} >

バクト マルトエキストラクト (Becton, Dickinson a  
nd Company 製)

30 g

バクト ソイトン (Becton, Dickinson and Company 製)

3 g

寒天 15 g

蒸留水 1000 ml

。

[0057] <CMA 培地 {コーンミール寒天 (Corn Meal Agar) 培地}

>

コーンミールアガール「ニッスイ」(日水製薬(株)製) 17 g

蒸留水 1000 ml

。

[0058] 以下の記載において、色調の表示は「メチューン・ハンドブック・オブ・カラー」(Kornerup, A. & Wanscher, J. H. 1978. Methuen handbook of colour (3rd. edition). Erye Methuen, London) に従った。

[0059] SANK 10312 株の菌学的性状は以下の通りである。

SANK 10312 株を4種類の培地(PDA 培地、OA 培地、CMA 培地、MEA 培地)に接種して、菌学的性状を観察した。

SANK 10312 株のPDA 培地での生育温度可能温度は9-33℃で、特に18-31℃で旺盛に生育した。

SANK 10312 株の菌学的性状は以下の通りである。

OA 培地でのコロニーは、28℃、10日の培養で直径80 mm以上である。コロニーは薄く、短い綿毛状の白色の菌糸からなり、灰黄色で、中央からやや離れたところは同心円状に灰茶色から黄茶色となる。コロニーの中心部の表面に小粒状の子のう果を密に形成し、暗緑色となる。裏面は淡黄色から茶橙色で、中心部ではオリーブ茶色で、中心部からやや離れたところは同

心円状に暗茶色になる。

MEA培地でのコロニーは、28℃、10日の培養で直径80mm以上である。コロニーは薄く、短い綿毛状の白色の菌糸からなり、茶橙色となる。分生子および子のう果は形成されない。裏面も同様となる。

CMA培地でのコロニーは、28℃、10日の培養で直径60mmとなる。コロニーは非常に薄く、菌糸が寒天表面に疎に生えるのみである。コロニーの表面の色はほぼ無色透明で、裏面も同様である。

SANK 10312株のPDA培地での生育温度可能温度は9–33℃で、特に18–31℃で旺盛に生育する。

SANK 10312株のOA培地での28℃、10日目の微細構造は以下のようなになる。

子のう果は暗茶色から黒色で、幅175–240 $\mu\text{m}$ 、高さ275–400 $\mu\text{m}$ の垂球形から卵形をしており、壁は交錯菌糸組織からなり、頂部に孔口を持つ。側毛はまっすぐあるいはわずかに波形となり、淡オリーブ色で、直径3.5 $\mu\text{m}$ 以下であり、子のう果の上部では頂毛と一体となる。頂毛は多数密生し、波形または先端に向かってゆるいコイル状にまき、全体に粗面で、隔壁を有し、先端は丸い。頂毛の幅は基部で3–4 $\mu\text{m}$ で、オリーブ色で、先端に向かって細まり淡色になる。子のうは棍棒形で、8孢子生である。子のう胞子はレモン形で、未熟な時は淡褐色で、成熟すると淡緑色から暗オリーブ茶色で、6.0–9.0 $\times$ 8.0–11.0 $\mu\text{m}$ になる。分生子は観察されない。

以上のような菌学的特徴は、Compendium of Soil Fungi (DOMSCH, K. H., W. GAMS and T.-H. ANDERSON (2007) Compendium of Soil Fungi, 2nd ed. revised by W. Gams, 2007, 382 figs, 672 p)に記載されているChaetomium globosum Kunzeの記載によく一致した。従って、本菌株をChaetomium globosum と同定し、Chaetomium

*globosum* SANK 10312と命名した。

SANK 10312株は、2012年12月18日付けで独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（住所：日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に国際寄託され、受託番号NITE BP-1486が付された。

[0060] SANK 10412株の菌学的性状は以下の通りである。

SANK 10412株を2種類の培地（PDA培地、MEA（CBS）培地）に接種して、菌学的性状を観察した。

SANK 10412株のPDA培地での生育温度可能温度は8-35℃で、特に25-35℃で旺盛に生育した。

SANK 10412株の菌学的性状は以下の通りである。

PDA培地でのコロニーは、23℃、4日の培養で直径7.0cmである。コロニーは薄く、菌糸は綿毛状で、中心部でやや密になり盛り上がる、白色を呈し、成熟すると胞子のう柄が発達し暗灰色となる。

MEA（CBS）培地でのコロニーは、23℃、4日の培養で直径6.0-6.5cmである。コロニーは薄く、菌糸は綿毛状で、白色を呈し、成熟すると胞子のう柄が発達し暗灰色となる。

SANK 10412株のMEA（CBS）培地での23℃、4日目の微細構造は以下のようになる。

胞子のう柄は直径6-13.5 $\mu$ mで、輪生または分枝し、それぞれの先端に頂のうを形成する。頂のうは垂球形から洋梨形で、幅13-35 $\mu$ mとなり、表面に多数の小柄を生じて先端に各1個の胞子のう胞子を形成する。胞子のう胞子は単独ではほぼ無色で、集合すると暗灰色から黒色となり、単細胞で、球形から楕円形、滑面あるいは短い棘を持ち、直径5.0-9.0 $\mu$ mとなる。接合胞子は観察されなかった。

以上のような菌学的特徴はCompendium of Soil Fungi（前出と同じ）のp164-165記載されているCunninghamella elegans Lendn. の記載によく一致した。従

って、本菌株を *Cunninghamella elegans* と同定し、*Cunninghamella elegans* SANK 10412 と命名した。

SANK 10412 株は、2012年12月18日付けで独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（住所：日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に国際寄託され、受託番号 NITE BP-1487 が付された。

[0061] SANK 10612 株の菌学的性状は以下の通りである。

SANK 10612 株を2種類の培地（PDA培地、MEA（CBS）培地）に接種して、菌学的性状を観察した。

SANK 10612 株のPDA培地での生育温度可能温度は10-31℃で、特に19-27℃で旺盛に生育した。

PDA培地でのコロニーは、20℃、4日の培養で直径7.5-8.0cmである。コロニーは中心部でやや密になり盛り上がり、菌糸は綿毛状で、茶色から茶灰色を呈し、縁辺部では白色となる。裏面も同様の色となる。胞子のう胞子を形成する。

MEA（CBS）培地でのコロニーは、20℃、4日の培養で直径6-6.5cmである。コロニーは薄く、菌糸は綿毛状で、白色を呈する。まばらに胞子のう胞子を形成する。

SANK 10612 株のMEA（CBS）での20℃、4日目の微細構造は以下ようになる。

胞子のう柄は直径16μm以下で、まれに仮軸分枝し、先端に胞子のうを形成する。胞子のうは初期は黄色く、成熟するにつれて暗茶色になり、直径70μm以下で、溶解性の壁を持つ。コルメラは球形から楕円形で、カラーを持ち、幅13.5-29.5μm、長さ15-32μmとなる。胞子のう胞子は無色で、単細胞で、平滑で、楕円形から腎臓形であり、大きさは変異が大きく3.0-9.5×2-5μmである。クラミドスポア、接合胞子は観察されなかった。

以上の上のような菌学的特徴は *Compendium of Soil Fungi* (前出に同じ) の p293-294 に記載されている *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* Wehmer の記載によく一致した。従って、本菌株を *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* と同定し、*Mucor hiemalis* f. *hiemalis* SANK10612 と命名した。

SANK 10612 株は、2012年12月18日付けで独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (住所: 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) に国際寄託され、受託番号 NITE BP-1488 が付された。

[0062] 周知の通り、真菌類は自然界において、又は人工的な操作 (例えば、紫外線照射、放射線照射、化学薬品処理等) により、変異を起こしやすく、本発明の SANK 10312 株、SANK 10412 株、及び SANK 10612 株もそのような変異を起こし易いと推測される。

本発明において、SANK 10312 株、SANK 10412 株、及び SANK 10612 株は、その全ての変異株を包含する。

また、これらの変異株の中には、遺伝的方法、たとえば組み換え、形質導入、形質転換等により得られたものも包含される。

即ち、本発明のテルペノイド誘導体を生産するために使用する変換菌 SANK 10312 株、SANK 10412 株、及び SANK 10612 株、それらの変異株およびそれらと明確に区別されない菌株は全て SANK 10312 株、SANK 10412 株、及び SANK 10612 株に包含される。

[0063] (2) 培養法と精製法 (本発明のテルペノイド誘導体の製造と精製)

上述の変換菌の培養は、一般に微生物の二次代謝産物の製造に使用されるような培地を用いて行なうことができる。そのような培地は、微生物が資化出来る炭素源、窒素源、無機塩、微量の生育因子、微量金属等を含有する。

[0064] 炭素源としては、例えば、グルコース、フルクトース、マルトース、シュ

ークロース、マンニトール、グリセリン、デキストリン、オート麦、ライ麦、デンプン、ジャガイモ、トウモロコシ粉、綿実油、糖蜜、クエン酸、酒石酸等が挙げられ、これらは単独又は併用して使用することができる。

炭素源の添加量は、通常、培地量の1乃至10重量%の範囲である。

[0065] 窒素源としては、通常、蛋白質およびその加水分解物を含有する物質または無機塩が使用される。

このような窒素源としては、例えば、大豆粉、フスマ、落花生粉、綿実粉、カゼイン加水分解物、ファーマミン、魚粉、コーンステープリカー、ペプトン、肉エキス、イースト、イーストエキス、マルトエキス、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等が挙げられ、これらは単独または併用して使用することができる。

窒素源の添加量は、通常、培地量の0.2乃至10重量%の範囲である。

[0066] また、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、アンモニウム、カルシウム、リン酸、硫酸、塩酸、炭酸等のイオンを得ることのできる塩類を培地中に加えてもよい。

さらに、菌の資化しうるビタミンB1、ビオチンのようなビタミン類、チアミンのような菌体増殖促進物質、マンガン、モリブデンのような金属の塩を培地に添加してもよい。

[0067] また、液体培地の場合、培地の泡立ちを防ぐため、シリコンオイル、ポリアルキレングリコールエーテル、植物油、動物油、界面活性剤のような消泡剤を培地に添加してもよい。

上述の変換菌の培養に用いる液体培地のpHは、菌株、本発明のテルペノイド誘導体のpH安定性等に依存する。

[0068] 変換菌の培養温度は、菌株、本発明のテルペノイド誘導体の熱安定性等に依存する。変換菌がSANK 10312株の場合、好適には9乃至33℃であり、より好適には20乃至35℃である。変換菌がSANK 10412株の場合、好適には8乃至35℃であり、より好適には20乃至35℃である。変換菌がSANK 10612株の場合、好適には10乃至31℃で

あり、より好適には20乃至27℃である。

[0069] 上述の変換菌の培養方法としては、特に限定はなく、例えば、固形培地を用いた培養法、攪拌培養法、振とう培養法、通気培養法、通気攪拌培養法等を挙げることができ、好適には、攪拌培養法、振とう培養法、通気培養法、通気攪拌培養法であり、より好適には振とう培養法である。工業的スケールで培養するには、通気攪拌培養法がより好適である。

変換菌の培養は、通常、変換菌を生やしたスラントを少量の培地に接種した種培養から始まり、必要に応じより大きな規模で種培養を再度行なった後、最終段階としてより大きな規模での本培養を行なうことによりなされる。

[0070] 上述の変換菌の小規模な培養を行なう場合、三角フラスコ等を用いて種培養を行い、必要に応じより大きな規模の種培養を再度行った後、三角フラスコ等を用いて本培養を行う。

上述の変換菌の大規模な培養を行なう場合、攪拌装置及び通気装置を付けたジャーファーマンター又はタンクを用いることが好ましい。このような装置を用いれば、培地をジャーファーマンター又はタンクの中で調製及び滅菌することができる。この方法は、大規模な製造に適している。

培養時間は通常、基質添加後、120乃至192時間の培養で最高値に達する。

[0071] 培養終了後、得られた培養物、その中に含まれる菌体及び／又はその培養上清から、本発明のテルペノイド誘導体を抽出することができる。菌体及びその他の固形分と培養上清とを分離するためには、遠心分離法又は珪藻土をろ過助剤とするろ過法を使用することができる。

[0072] 本発明のテルペノイド誘導体の抽出にはこれらの化合物の物理化学的性状を利用することができる。培養ろ液又は培養上清中に存在する本発明のテルペノイド誘導体は、水と混和しない有機溶剤、例えば、酢酸エチル、クロロホルム、塩化エチレン、塩化メチレン、ブタノール、それら2つ以上の混合溶媒等により抽出することができる。菌体内に存在する本発明のテルペノイド誘導体は、50乃至90%の含水アセトン又は含水メタノールを用いて菌

体から抽出し、有機溶媒を留去した後、培養ろ液又は培養上清中に存在する場合と同様に抽出することができる。全培養物中に存在する本発明のテルペノイド誘導体は、全培養物にアセトン又はメタノールを20乃至80%、好適には40乃至60%、より好適には50%添加し、抽出することができる。抽出終了後、珪藻土をろ過助剤としてろ過し、得られた可溶物から、培養ろ液又は培養上清中に存在する場合と同様に抽出することができる。

[0073] 上述の抽出物からの本発明のテルペノイド誘導体を単離するための精製は、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC）等の精製手段により行なうことができる。

[0074] 吸着クロマトグラフィーは、本発明のテルペノイド誘導体を含む上述の抽出液を吸着剤と接触させ、夾雑物を吸着させて取り除くか、又は本発明のテルペノイド誘導体を吸着させて夾雑物を除去した後、溶出させることにより行なう。吸着剤としては、例えば、活性炭、アンバーライトXAD-2、同XAD-4、同XAD-16（以上、ローム・アンド・ハース社製）、ダイヤイオンHP-20、同HP-21、同HP-20SS、セパビーズSP-207、同SP-850、同SP-700（三菱化学（株）製）等を挙げることができる。吸着させた本発明のテルペノイド誘導体の溶出に使用する溶媒としては、例えば、メタノール、アセトン、ブタノール、アセトニトリル等の有機溶媒およびこれらの水混液を挙げることができる。

[0075] イオン交換クロマトグラフィーは、本発明のテルペノイド誘導体が中性物質として挙動することを利用して行なう。すなわち、本発明のテルペノイド誘導体を含む上述の抽出液を例えばイオン交換担体と接触させて不要物を該担体に吸着させ、本発明のテルペノイド誘導体を通過させる。イオン交換担体としては、DEAE-セファデックス、DEAE-セファロース、QAE-セファデックス、CM-セファデックス、SP-セファデックス（以上、GEヘルスケア社製）、DEAE-トヨパール、QAE-トヨパール、CM-トヨパール、SP-トヨパール（東ソー（株）製）、デュオライトA11

3LF、同A116、同A368S、同A375LF、同C20J、同C433LF（ダイヤモンド・シャムロック・ケミカル社製）、アンバーライトIRA-67、同IRA-98、同IRA400J、同IRA458RF、同IR120B、同IRC76、（ローム・アンド・ハース社製）、ダウエックス50WX4、同HCR-S、同1×4、同22、66、同SBR-P（ダウ・ケミカル社製）等を挙げることができる。

[0076] 分配クロマトグラフィーに使用する担体としては、例えば、シリカゲル、TSKゲルトヨパールHW-40F（東ソー（株）製）、セファデックスLH-20（GEヘルスケア社製）、セルロース（メルク社製）等を挙げることができる。

[0077] 逆相クロマトグラフィーに使用する担体としては、例えば、コスモシール140C18（ナカライテスク（株）製）、ODS-A（ワイエムシィ（株）製）等を挙げることができる。

[0078] HPLCに使用するカラムとしては、例えば、ショウデックスアサヒパックODP50-4E（昭和電工（株）製）、YMCパックODS-A（ワイエムシィ（株）製）、カプセルパックUG120（資生堂（株）製）、ユニゾンC18（インタクト（株）製）の如き逆相カラム等を挙げることができる。

[0079] これらの精製手段を単独で、又は適宜組み合わせることにより、本発明のテルペノイド誘導体を単離することができる。必要なら同じ精製手段を反復してもよい。各精製手段の実施には、カラムクロマトグラフィー法、バッチクロマトグラフィー法、薄層クロマトグラフィー法等、精製に適した方法を選択することができる。

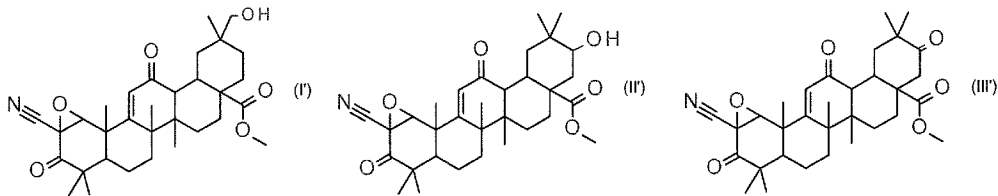
[0080] 得られた本発明のテルペノイド誘導体の立体構造は、原料化合物の立体構造に由来している。原料化合物にあらたに導入した置換基の立体は、二次元核磁気共鳴スペクトル（NOESY）を用いて決定した。

例えば、前述の（2）に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体Aの平面構造式は、下記式（1'）のように示される。原料化合物の立体

構造と、(2)に記載の物理化学的性状、および、後述する実施例3に記載の二次元核磁気共鳴スペクトル(NOE SY)の測定結果から、テルペノイド誘導体Aの立体構造を、式(1)で表される立体構造と決定した。

同様に、前述の(4)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体Bの平面構造式は下記式(11')のように示され、前述の(6)に記載の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体Cの平面構造式は下記式(111')のように示される。原料化合物の立体構造と、(4)に記載の物理化学的性状、(6)に記載の物理化学的性状、および、後述する実施例1に記載の二次元核磁気共鳴スペクトル(NOE SY)の測定結果から、テルペノイド誘導体Bとテルペノイド誘導体Cの立体構造を、それぞれ、式(11)、式(111)で表される立体構造と決定した。

[化16]



### [0081] 3. 本発明のテルペノイド誘導体を含む医薬

上述の様に精製された本発明のテルペノイド誘導体は、Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路を活性化する作用を有し、抗炎症作用、細胞保護作用を有する。

Keap1/Nrf2/AREシグナル伝達経路が活性化されると、その標的遺伝子であるNAD(P)H:quinone oxidoreductase-1(NQO1)、heme oxygenase-1(HO-1)、 $\gamma$ -glutamate cysteine ligase catalytic subunit(GCLC)等が誘導される(非特許文献1)。これらの酵素量が増加あるいは活性化されると、細胞は毒物、酸化ストレス、炎症等に対して耐性となるため、本発明のテルペノイド誘導体は、以下に示す眼疾患、腎疾患、肝疾患、糖尿病およびその合併症等の疾患の予防剤又は治療剤と

して有用である。

眼疾患として、アレルギー性結膜疾患、ウイルス性結膜炎、翼状片、角膜感染症、ドライアイ、角膜障害（角膜上皮障害、及び／又は、角膜内皮障害である）、ぶどう膜炎、ベーチェット病、糖尿病網膜症、網膜剥離、網膜静脈閉塞（Retinal Vein Occlusion: RVO）、中心性漿液性脈絡網膜症、加齢黄斑変性（Age-related Macular Degeneration: AMD）、糖尿病黄斑浮腫（Diabetic Macular Edema: DME）、黄斑疾患、網膜色素変性、緑内障、白内障などの疾患が例示される。

腎疾患として、急性腎炎、慢性腎炎、急性腎不全、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、IgA腎症、糖尿病腎症、痛風腎、腎硬化症、水腎症、尿細管間質性腎炎、冠動脈バイパス手術後の腎機能低下、腎尿路感染症などの腎障害に起因する疾患が例示される。

呼吸器疾患として、気管支炎、肺炎、胸膜炎、慢性閉塞性肺疾患（Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD）、急性肺障害（acute lung injury: ALI）、びまん性汎細気管支炎、肺気腫、喘息などが例示される。

肝疾患として、アルコール性脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症、肝硬変、肝移植に伴う肝機能障害などが例示される。

脳疾患として、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）、脳梗塞、多発性硬化症（multiple sclerosis: MS）などが例示される。

心臓疾患として、心筋梗塞などが例示される。

糖尿病およびその合併症として、糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害が例示される。

[0082] これらの疾患の中でも、特に、

眼疾患として、ドライアイ、角膜障害（角膜上皮障害、及び／又は、角膜内

皮障害である)、ぶどう膜炎、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑浮腫、緑内障、腎疾患として、糖尿病腎症が、呼吸器疾患として、慢性閉塞性肺疾患、急性肺障害、肝疾患として、非アルコール性脂肪性肝炎、肝移植に伴う肝機能障害、脳疾患として、脳梗塞、多発性硬化症の予防剤もしくは治療剤として有用である。

[0083] これらの疾患の中でも、さらに、ドライアイの予防又は治療剤、角膜上皮、及び／又は、角膜内皮の障害の予防又は治療剤、加齢黄斑変性の予防又は治療剤、糖尿病黄斑浮腫、及び／又は、網膜静脈閉塞の予防又は治療剤、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤、脳梗塞の予防又は治療剤、多発性硬化症の予防又は治療剤として好適である。

[0084] 本発明のテルペノイド誘導体を医薬として用いる場合、種々の形態で投与され得る。その投与形態は、製剤、年齢、性別、疾患等に依存する。例えば、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤等は経口投与される。注射剤等は静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、硝子体内投与、前房内投与、結膜下投与、テノン嚢投与又は腹腔内投与される。点眼剤は点眼投与される。眼軟膏剤は眼粘膜に使用する。坐剤は直腸内投与される。また、いずれの投与方法も徐放製剤化して投与することもある。

[0085] 本発明のテルペノイド誘導体を有効成分として含有する各種製剤は、常法に従い、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、矯味矯臭剤、コーティング剤等、医薬製剤分野において通常使用し得る公知の補助剤を用いて製造することができる。

[0086] 錠剤の形態に成形するに際しては、担体として当該分野で公知のものを広く使用でき、例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、澱粉、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、珪酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、澱粉液、ゼラチン溶液、

カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥澱粉、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、澱粉、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第四級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、澱粉等の保湿剤、澱粉、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状珪酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、硼酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を挙げることができる。錠剤は、必要に応じ、通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠あるいは二重錠、多重錠とすることができる。

[0087] 丸剤の形態に成形するに際しては、担体として当該分野で公知のものを広く使用でき、例えば、ブドウ糖、乳糖、澱粉、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナラン、カンテン等の崩壊剤を挙げることができる。

[0088] 注射剤として調製される場合、液剤及び懸濁剤は殺菌され、且つ血液と等張であるのが好ましく、これら液剤、乳剤および懸濁剤の形態に形成するに際しては、希釈剤として当該分野において公知のものを広く使用でき、例えば、水、エチルアルコール、プロピレングリコール、エポキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。等張を維持するために十分な量の食塩、ブドウ糖又はグリセリンを含有せしめてもよい。溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤、着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤、他の薬剤等を含有せしめてもよい。

なお、注射剤を静脈内投与する場合、単独で、ブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して、又は、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル

類等とのエマルジョンとして投与され得る。

- [0089] 点眼剤の形態に成形するに際しては、液剤及び懸濁剤は殺菌され、且つ血液と等張であるのが好ましく、これら液剤、乳剤および懸濁剤の形態に成形するに際しては、希釈剤として当該分野において公知のものを広く使用できる。また、添加物として防腐剤、清涼剤、pH調整剤などを挙げることができる。
- [0090] 眼軟膏剤として調製する場合は、無菌であること、粘膜刺激がないこと、目から吸収されないこと、滑りがよいことなどが求められる。基剤としては、軟稠性の眼科用ワセリン等が挙げられる。有効成分を固形のまま微粉末にして分散させる場合には流動パラフィン、液状の場合には精製ラノリンの使用が挙げられる。
- [0091] 坐剤の形態に成形するに際しては、担体として当該分野で公知のものを広く使用でき、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライド等を挙げることができる。
- [0092] 徐放製剤化に関しては、当該分野で公知のものを広く使用でき、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸グリコール酸共重合体などの生分解性ポリマー等を挙げることができる。徐放製剤として、粉末化での徐放化を目指した粉末製剤の他に、化合物単体あるいは徐放化した粉末をロッド状、シート状、フィルム状、ディスク状またはマイクロカプセル状等にした剤型、およびそれらを使用したインプラント剤型も含む。
- [0093] 上述の医薬製剤に含有せしめる本発明のテルペノイド誘導体の量は、特に限定されないが、好適には1乃至80重量%であり、より好適には1乃至50重量%である。
- [0094] 本発明のテルペノイド誘導体の投与量は、症状、年齢などにより異なるが、局所投与の場合は、 $0.0001 \mu\text{g}/\text{site}$ 乃至 $100 \mu\text{g}/\text{site}$ である。全身投与の場合の投与量は、 $0.00001 \text{mg}/\text{kg}$ 乃至 $10 \text{mg}/\text{kg}$ である。

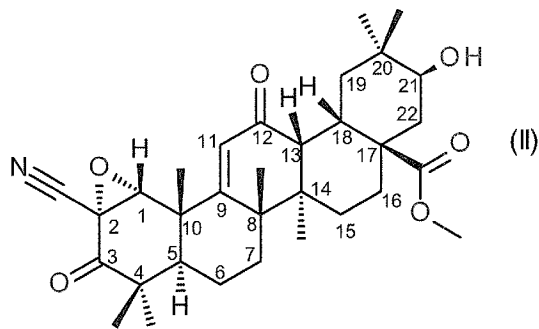
[0095] 本発明のテルペノイド誘導体を有効成分として含有する医薬製剤の投与回数は、1日複数回、1日1回、又は数日に1回である。徐放化製剤の場合は、2週間に1回、4週間に1回、3ヶ月に1回、又は6ヶ月に1回が目安である。

[0096] 次に、実施例、試験例及び製剤例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

### 実施例 1

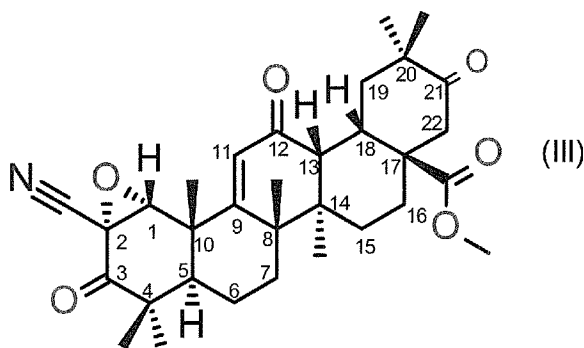
[0097] テルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cの製造

[化17]



テルペノイド誘導体B

[化18]



テルペノイド誘導体C

[0098] (1) ケトミウム属変換菌の培養

100ml容の三角フラスコ4本に下記表1に示す組成の種培養培地を各々20mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、SANK 10312株の孢子懸濁液を1ml接種し、回転振とう培養機で

23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。得られた培養液を、以下、「種培養液」という。

[0099] 表1. SANK 10312株の種培養培地の培地組成

[表1]

グリセリン	30g
グルコース	30g
可溶性澱粉	20g
大豆粉	10g
ゼラチン	2.5g
イーストエキス (Difco)	2.5g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.5g
寒天	3g
消泡剤 *1	0.1ml
水道水	1000ml

\*1 ニッサン・ディスフォームCB-442 (日本油脂 (株) 製)

\*2 pHは無修正。

[0100] 500ml容の三角フラスコ13本に下記表2に示す組成の本培養培地を各々80mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、上述のSANK 10312株の種培養液を無菌的に各4ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。この培養液に10mg/mlの濃度でジメチルスルホキシドに溶解したCDDO-Meの溶液を各々0.8mlずつ添加し、再度回転振とう培養機で23℃、210rpmで6日間培養を行った。

[0101] 表2. 本培養培地の培地組成

[表2]

グリセリン	30 g
グルコース	30 g
可溶性澱粉	20 g
大豆粉	10 g
ゼラチン	2.5 g
イーストエキス (Difco)	2.5 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.5 g
消泡剤 *1	0.1 ml
水道水	1000 ml

\*1 ニッサン・デイスフォームCB-442 (日本油脂 (株) 製)

\*2 pHは無修正。

[0102] (2) テルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cの単離

本実施例におけるテルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cの挙動は、以下に示す条件のHPLCでモニターした。

[0103] カラム: Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm: インタクト (株) 製)

溶 媒: A: 0.01%ギ酸を含む10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸を含むアセトニトリル

A/B = 5/5で平衡化したのちA/B = 1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速: 1.0 ml/分

検 出: 紫外外部吸収 λ230 nm

保持時間: 4.9分 (テルペノイド誘導体B)

6.1分 (テルペノイド誘導体C)

[0104] (1) において得られた培養液1040 mlに等量のアセトンを添加し、室温で1時間静置後、菌体を吸引濾過によって取り除き、濾液2000 mlを得た。この濾液に酢酸エチル1 Lを添加し、液々分配することで目的化合物を含む有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥

後、溶剤を留去することによって、テルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cを含む粉末549.9mgを得た。この粉末のうち275mgをメタノール1.37mlに溶解し、そのうち0.2mlを予め0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45：55の溶媒で平衡化したHPLCカラム（Unison US-C18：直径20mm×長さ150mm：インタクト（株）製）に供与し、0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45：55の溶媒で流速18.0ml/分で溶出した。目的化合物の紫外部吸収を波長 $\lambda = 230\text{nm}$ にて検出し、保持時間12.3分に現れるピーク（テルペノイド誘導体B）と、保持時間23.9分に現れるピーク（テルペノイド誘導体C）を7回に分けて分取した。分取液を合併して、減圧濃縮して得られた懸濁液を凍結乾燥し、テルペノイド誘導体Bを無色粉末として16.2mg、テルペノイド誘導体Cを無色粉末として2.4mg得た。

[0105] 得られた本発明のテルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cの立体構造は、二次元核磁気共鳴スペクトル（NOESY）を用いて決定した。

テルペノイド誘導体Bは、二次元核磁気共鳴スペクトル（NOESY）において、1位のプロトンと10位のメチル基のプロトン、及び、19位の $\beta$ -プロトンと21位の $\beta$ -プロトンに相関が観察されたことから、立体構造を式（11）のように決定した。

テルペノイド誘導体Cは、二次元核磁気共鳴スペクトル（NOESY）において、1位のプロトンと10位のメチル基のプロトンに相関が観察されたことから、立体構造を式（111）のように決定した。

[0106] テルペノイド誘導体Bの物理化学的性状の測定値

- 1) 物質の性状：無色粉末状物質
- 2) 分子式： $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{NO}_6$
- 3) 分子量：537（ESIマスマスペクトル法により測定）
- 4) 高分解能LC-ESIマスマスペクトル法により測定した精密質量、 $[\text{M} + \text{H}]^+$ は次に示す通りである。

実測値：538.31573

計算値：538.31631

5)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル(500 MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.99 (3H, s), 0.99 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.12 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.19-1.22 (1H, m), 1.27 (3H, s), 1.27 (3H, s), 1.29-1.35 (1H, m), 1.45-1.49 (1H, m), 1.62-1.66 (1H, m), 1.58-1.67 (2H, m), 1.64-1.69 (1H, m), 1.72-1.75 (1H, m), 1.69-1.79 (2H, m), 1.88 (2H, dd,  $J=10.0\text{ Hz}$ ,  $3.0\text{ Hz}$ ), 1.96 (1H, dd,  $J=10.0\text{ Hz}$ ,  $4.5\text{ Hz}$ ), 2.97 (1H, s), 3.04 (1H, dd,  $J=10.0\text{ Hz}$ ,  $4.5\text{ Hz}$ ), 3.49 (1H, dd,  $J=11.5\text{ Hz}$ ,  $5.0\text{ Hz}$ ), 3.70 (3H, s), 4.34 (1H, s), 6.08 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル(125 MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 16.6 (q), 18.5 (t), 21.6 (q $\times$ 2), 23.0 (q), 24.0 (q), 24.1 (t), 28.2 (q), 28.4 (t), 29.3 (q), 31.3 (d), 31.6 (d), 36.1 (t), 36.2 (s), 40.4 (t), 41.1 (s), 42.2 (s), 42.8 (d), 45.3 (s), 45.8 (s), 49.1 (s), 49.3 (d), 52.3 (s), 53.4 (s), 69.2 (d), 73.9 (t), 113.7 (s), 125.0 (d), 168.9 (s), 176.8 (s), 198.9 (s), 202.5 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6mm×長さ75mm：インタクト(株)製)

溶媒：A：0.01%ギ酸含有10mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=45/55のアイソクラティック

流速：1.0ml/分

温度：40℃

検出：紫外吸収  $\lambda$  230nm

保持時間：3.8分、

8) テルペノイド誘導体Bの $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトルを図4に、二次元核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトル)を図5に示す。  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトルと二次元核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトル)の解析の結果、各プロトンを以下のように帰属した。

1位のプロトン：4.34ppm(メチン)

10位のメチル基のプロトン：1.27ppm(メチル)

19位の $\beta$ -プロトン：1.29-1.35ppm(メチン)

21位の $\beta$ -プロトン：3.49ppm(メチン)

9) テルペノイド誘導体Bの二次元核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESYスペクトル)を図6に示す。図6において、1位のプロトンと10位のメチル基のプロトン、及び、19位の $\beta$ -プロトンと21位の $\beta$ -プロトンに相関が認められることから、立体構造を(11)のように決定した。

[0107] テルペノイド誘導体Cの物理化学的性状の測定値

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{NO}_6$

3) 分子量：535 (ESIマスマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスマスペクトル法により測定した精密質量、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ は次に示す通りである。

実測値：536.30023

計算値：536.30066

5)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル(500 MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 1.04 (3H, s), 1.05 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.20-1.26 (1H, m), 1.30 (m, 3H), 1.29 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1.47-1.50 (1H, m), 1.63-1.68 (2H, m), 1.59-1.68 (2H, m), 1.65-1.67 (1H, m), 1.64-1.73 (2H, m), 1.71 (1H, d,  $J=13.5\text{ Hz}$ ), 1.98 (1H, d,  $J=13.5\text{ Hz}$ ), 2.03 (1H, dd,  $J=14.0\text{ Hz}$ ,  $3.5\text{ Hz}$ ), 2.27 (1H, d,  $J=14.5\text{ Hz}$ ), 2.85 (1H, d,  $J=14.5\text{ Hz}$ ), 3.05 (1H, d,  $J=4.5\text{ Hz}$ ), 3.38 (1H, brd,  $J=13.5\text{ Hz}$ ), 3.74 (3H, s), 4.34 (1H, s), 6.12 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル(125 MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 18.4 (t), 21.6 (q $\times$ 2), 23.0 (q), 24.1 (q $\times$ 2), 25.5 (q), 25.6 (t), 28.2 (q), 28.3 (t), 31.5 (t), 31.7 (d), 37.4 (t), 41.2 (s), 42.1 (s), 42.8 (d), 45.3 (s), 45.6 (s), 45.9 (s), 47.0 (t), 49.1 (d), 51.1 (s), 52.7 (q), 53.4 (s), 69.2 (d), 113.7 (s), 124.8 (d), 169.4 (s), 175.5 (s), 198.5 (s), 202.4 (s), 213.4 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6mm×長さ75mm：インタクト(株)製)

溶媒：A：0.01%ギ酸含有10mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=45/55のアイソクラティック

流速：1.0ml/分

温度：40℃

検出：紫外吸収  $\lambda$  230nm

保持時間：6.2分、

8) テルペノイド誘導体Cの $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトルを図7に、二次元核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトル)を図8に示す。  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトルと二次元核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトル)の解析の結果、各プロトンを以下のように帰属した。

1位のプロトン：4.34ppm(メチン)

10位のメチル基のプロトン：1.30ppm(メチル)

9) テルペノイド誘導体Cの二次元核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESYスペクトル)を図9に示す。図9において、1位のプロトンと10位のメチル基のプロトンに相関が認められたことから、立体構造を(III)のように決定した。

## 実施例 2

[0108] テルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cの製造

(1) ムコール属変換菌の培養

100ml容の三角フラスコに上記表1に示す組成の種培養培地を20ml入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、SANK 10612株の孢子懸濁液を1ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。得られた培養液を、以下、「種培養液」という。

[0109] 500 ml 容の三角フラスコに上記表 2 に示す組成の本培養培地を 80 ml 入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、上述のSANK 10612株の種培養液を無菌的に4 ml 接種し、回転振とう培養機で23℃、210 rpmの条件下で2日間培養した。この培養液に10 mg/mlの濃度でジメチルスルホキシドに溶解したCDDO-Meの溶液を0.8 ml 添加し、再度回転振とう培養機で23℃、210 rpmで10日間培養を行った。

[0110] (2) テルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cの単離

本実施例におけるテルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cの挙動は、以下に示す条件のHPLCでモニターした。

[0111] カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト(株)製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸を含む10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸を含むアセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速：1.0 ml/分

温 度：40℃

検 出：紫外外部吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：4.9分(テルペノイド誘導体B)

6.1分(テルペノイド誘導体C)

[0112] (1)において得られた培養液のうち1 mlを抜き取り、アセトニトリル0.5 ml、エタノール0.5 mlを添加し、室温で1時間静置した後、10000 rpm、10分の遠心分離処理を行い、その上清を培養液抽出物とした。

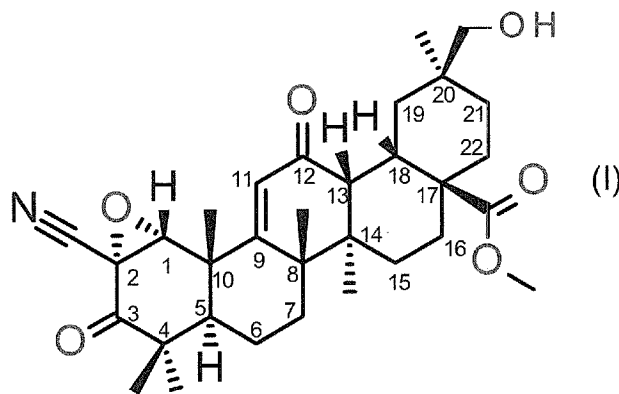
このようにして調整した培養液抽出物10  $\mu$  lを上記HPLC条件で溶出した。目的化合物の紫外外部吸収を波長 $\lambda$ =230 nmにて検出し、保持時間4.9分に現れるピーク(テルペノイド誘導体B)、保持時間6.1分に現

れるピーク（テルペノイド誘導体C）のピーク面積よりCDDO-Meに対する変換効率を算出したところ、テルペノイド誘導体Bを10%、テルペノイド誘導体Cを1%確認した。なお、標品は実施例1で得られたテルペノイド誘導体B、テルペノイド誘導体Cを使用した。

### 実施例 3

[0113] テルペノイド誘導体Aの製造

[化19]



テルペノイド誘導体A

[0114] (1) カニングハマラ属変換菌の培養

100ml容の三角フラスコ10本に上記表1に示す組成の種培養培地を20mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、SANK 10412株の孢子懸濁液を1ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。（得られた培養液を、以下、「種培養液」という。）

[0115] 500ml容の三角フラスコ30本に上記表2に示す組成の本培養培地を各々80mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、上述の種培養液を無菌的に各4ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。この培養液に10mg/mlの濃度でジメチルスルホキシドに溶解したCDDO-Meの溶液を各々0.8mlずつ添加し、再度回転振とう培養機で23℃、210rpmで7日間培養を行った。

## [0116] (2) テルペノイド誘導体 A の単離

本実施例におけるテルペノイド誘導体 A の挙動は、以下に示す条件の HPLC でモニターした。

## [0117] カラム : Unison UK-C18

(直径 4.6 mm × 長さ 75 mm : インタクト (株) 製)

溶 媒 : A : 0.01% ギ酸を含む 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液

B : 0.01% ギ酸を含む アセトニトリル

A/B = 5/5 で平衡化したのち A/B = 1/9 まで 7 分間の直線グラジエント

流 速 : 1.0 ml / 分

温 度 : 40 °C

検 出 : 紫外部吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間 : 5.9 分

[0118] (1) において得られた培養液 2400 ml に等量のアセトンを添加し、室温で一晩静置後、菌体を吸引濾過によって取り除き、濾液 4500 ml を得た。この濾液を、あらかじめ水で平衡化したダイヤイオン SP207 (150 mL : 三菱化学 (株) 製) カラムに付した。カラムを蒸留水 : アセトン = 5 : 5 の溶媒 600 ml で洗浄した後、蒸留水 : アセトン = 4 : 6 の溶媒 450 ml で溶出し、次いで蒸留水 : アセトン = 7 : 3 の溶媒 900 ml で溶出した。このようにして得られた画分のうち目的化合物が含まれる溶出液を合わせた後濃縮し、次いで凍結乾燥を行うことでテルペノイド誘導体 A を含む粉末 390.6 mg を得た。この粉末をジメチルスルホキシド 3.9 ml に溶解し、そのうち 0.5 ml をあらかじめ 0.01% ギ酸水溶液 : 0.01% ギ酸含有アセトニトリル = 45 : 55 の溶媒で平衡化した HPLC カラム (Unison US-C18 : 直径 20 mm × 長さ 150 mm : インタクト (株) 製) に供与し、0.01% ギ酸水溶液 : 0.01% ギ酸含有アセトニトリル = 45 : 55 の溶媒で流速 18.0 ml / 分で溶出した。目的化合物の紫外部吸収を波長  $\lambda$  = 230 nm にて検出し、保持時間 16.8 分

に現れるピークを6回に分けて分取した。分取液をまとめ、減圧濃縮して得られた懸濁液を凍結乾燥し、テルペノイド誘導体Aを無色粉末として1.9 mg得た。

[0119] テルペノイド誘導体Aの物理化学的性状の測定値

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{32}H_{43}NO_6$

3) 分子量：537 (ESIマスマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値：538.31549

計算値：538.31631

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル(500 MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 0.92 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.12 (3H, s), 1.14-1.17 (1H, m), 1.19 (3H, s), 1.22-1.24 (1H, m), 1.18-1.25 (1H, m), 1.28 (3H, s), 1.28 (3H, s), 1.46-1.48 (1H, m), 1.48-1.52 (1H, m), 1.50-1.54 (1H, m), 1.59-1.67 (2H, m), 1.62-1.66 (1H, m), 1.64-1.67 (1H, m), 1.75 (1H, d,  $J=13.5$  Hz), 1.80-1.83 (1H, m), 1.85-1.87 (2H, m), 1.98 (1H, dd,  $J=9.0$  Hz,  $4.5$  Hz), 2.95 (1H, s), 2.98 (1H, brs), 3.45 (1H, d,  $J=11.5$  Hz), 3.70 (3H, s), 3.73 (1H, d,  $J=11.5$  Hz), 4.34 (1H, s), 6.11 (1H, s) ppm

6)  $^{13}C$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}C$ -核磁気共鳴スペクトル(125 MHz)

) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 18.5 (t), 21.1 (q), 21.6 (q), 23.0 (q),  
24.0 (q), 24.1 (t), 27.3 (q), 28.2 (q), 28  
. 6 (t), 29.6 (t), 31.0 (d), 31.5 (t), 31.6  
(t), 32.4 (t), 35.7 (s), 41.2 (s), 42.3 (s  
) , 42.8 (d), 45.3 (s), 45.8 (s), 47.1 (s),  
49.6 (d), 52.3 (q), 53.5 (s), 67.6 (t), 69  
. 3 (d), 113.7 (s), 124.8 (d), 169.8 (s), 1  
78.0 (s), 199.6 (s), 202.5 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6mm×長さ75mm:インタクト(株)製)

溶媒: A: 0.01%ギ酸含有10mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=45/55のアイソクラティック

流速: 1.0ml/分

温度: 40°C

検出: 紫外吸収  $\lambda$  230nm

保持時間: 5.8分、

8) テルペノイド誘導体Aの $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトルを図1に、二次元核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトル)を図2に示す。  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトルおよび二次元核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトル)の解析の結果、各プロトンを以下のように帰属した。

1位のプロトン: 4.34 ppm (メチン)

10位のメチル基のプロトン: 1.28 ppm (メチル)

18位のプロトン: 2.98 ppm (メチン)

20位のヒドロキシメチル基のメチレンプロトン: 3.73 ppm、3.

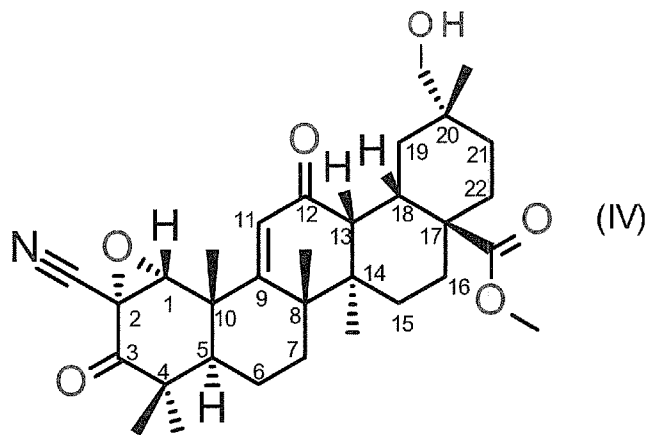
45 ppm (メチレン)

9) テルペノイド誘導体Aの二次元核磁気共鳴スペクトル(1H-1H NOESYスペクトル)を図3に示す。図3において、1位のプロトンと10位のメチル基のプロトン、及び、18位の $\alpha$ -プロトンと20位のヒドロキシメチル基のメチレンプロトンに相関が認められたことから、立体構造を(1)のように決定した。

#### 実施例 4

[0120] テルペノイド誘導体Dの製造

[化20]



テルペノイド誘導体D

[0121] (1) カニングハマラ属変換菌の培養

100 ml容の三角フラスコ10本に上記表1に示す組成の種培養培地を20 mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、SANK 10412株の孢子懸濁液を1 ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210 rpmの条件下で2日間培養した。得られた培養液を、以下、「種培養液」という。

[0122] 500 ml容の三角フラスコ30本に上記表2に示す組成の本培養培地を各々80 mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、上述の種培養液を無菌的に各4 ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210 rpmの条件下で2日間培養した。この培養液に10 mg/mlの濃

度でジメチルスルホキシドに溶解したCDDO-Meの溶液を各々0.8 mlずつ添加し、再度回転振とう培養機で23℃、210 rpmで7日間培養を行った。

[0123] (2) テルペノイド誘導体Dの単離

本実施例におけるテルペノイド誘導体Dの挙動は、以下に示す条件のHPLCでモニターした。

[0124] カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト(株)製)

溶媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流速：1.0 ml/分

温度：40℃

検出：紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：5.2分

[0125] (1) において得られた培養液2400 mlに等量のアセトンを添加し、室温で一晩静置後、菌体を吸引濾過によって取り除き、濾液4500 mlを得た。この濾液を、あらかじめ水で平衡化したダイヤイオンSP207 (150 mL：三菱化学(株)製)カラムに付した。カラムを蒸留水：アセトン=5：5の溶媒1000 mlで洗浄した後、蒸留水：アセトン=4：6の溶媒450 mlで溶出し、次いで蒸留水：アセトン=7：3の溶媒900 mlで溶出した。このようにして得られた画分のうち目的化合物が含まれる溶出液を合わせた後濃縮し、次いで凍結乾燥を行うことでテルペノイド誘導体Dを含む抽出物を390.6 mgを得た。この粉末をジメチルスルホキシド3.9 mlに溶解し、そのうち0.5 mlをあらかじめ0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45：55の溶媒で平衡化したHPLCカラム(Unison US-C18：直径20 mm×長さ150 mm

: インタクト (株) 製) に供与し、0.01%ギ酸水溶液:0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45:55の溶媒で流速18.0ml/分で溶出した。目的化合物の紫外部吸収を波長 $\lambda=230\text{nm}$ にて検出し、保持時間12.8分に現れるピーク(テルペノイド誘導体D)を6回に分けて分取した。分取液をまとめ、減圧濃縮して得られた懸濁液を凍結乾燥し、テルペノイド誘導体Dを無色粉末として8.8mg得た。

[0126] テルペノイド誘導体Dの物理化学的性状の測定値

1) 物質の性状: 無色粉末状物質

2) 分子式:  $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{NO}_6$

3) 分子量: 537 (ESIマスマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスマスペクトル法により測定した精密質量、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ は次に示す通りである。

実測値: 538.31592

計算値: 538.31631

5)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 1.05 (3H, s), 1.11 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.25-1.27 (1H, m), 1.27-1.29 (1H, m), 1.30 (3H, s), 1.30 (3H, s), 1.40 (1H, brt,  $J=13.0\text{Hz}$ ), 1.48-1.52 (1H, m), 1.50-1.54 (1H, m), 1.58-1.60 (1H, m), 1.60-1.63 (1H, m), 1.62-1.71 (2H, m), 1.66-1.70 (1H, m), 1.69-1.73 (1H, m), 1.76-1.82 (1H, m), 1.90-1.94 (1H, m), 1.93-1.99 (1H, m), 2.01 (1H, dd,  $J=4.5\text{Hz}$ ,  $10.0\text{Hz}$ ), 3.02 (1H, d,  $J=4.5\text{Hz}$ ), 3.12 (1H, dt,  $J=3.5\text{Hz}$ ,  $13.5\text{Hz}$ ), 3.32 (3H, s), 3.74 (3

H, s), 4.36 (1H, s), 6.11 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 18.3 (t), 18.7 (q), 21.4 (q), 21.5 (q), 22.7 (t), 22.8 (q), 23.9 (q), 28.0 (q), 28.2 (t), 28.7 (t), 30.1 (t), 30.8 (d), 31.4 (t), 32.0 (t), 35.8 (s), 40.9 (s), 42.0 (s), 42.5 (d), 45.1 (s), 45.6 (s), 47.4 (s), 49.6 (d), 52.0 (q), 53.2 (s), 69.1 (d), 74.2 (t), 113.6 (s), 124.8 (d), 168.7 (s), 178.0 (s), 198.7 (s), 202.4 (s) ppm

7) 液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト (株) 製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速：1.0 ml/分

温 度：40°C

検 出：紫外部吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：5.2分、

8) テルペノイド誘導体Dの $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトルを図10に、二次元核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトル) を図11示す。 $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトルおよび二次元核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトル) の解析の結果、各プロトンを以下のように帰属した。

1位のプロトン：4.36 ppm (メチン)

10位のメチル基のプロトン：1.30 ppm

18位の $\alpha$ -プロトン：3.12 ppm (メチン)

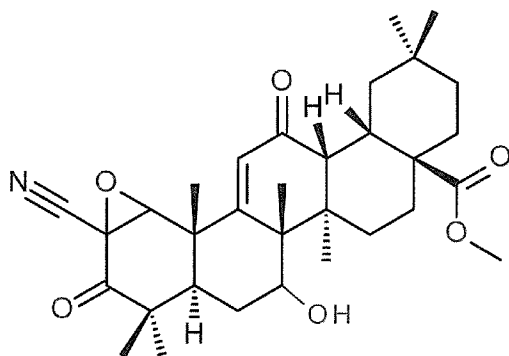
20位のメチル基のプロトン：1.05 ppm (メチレン)

9) テルペノイド誘導体Dの二次元核磁気共鳴スペクトル ( $1\text{H}-1\text{H}$  NOESYスペクトル) を図12に示す。図12において、1位のプロトンと10位に結合したメチル基のプロトン、及び、18位の $\alpha$ -プロトンと20位のメチル基のプロトンに相関が認められたことから、立体構造を(IV)のように決定した。

### 実施例 5

[0127] テルペノイド誘導体Hの製造

[化21]



テルペノイド誘導体H

[0128] (1) カニングハメラ属変換菌の培養

100 ml 容の三角フラスコ10本に上記表1に示す組成の種培養培地を20 ml ずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、SANK 10412株の孢子懸濁液を1 ml 接種し、回転振とう培養機で23℃、210 rpmの条件下で2日間培養した。(得られた培養液を、以下、「種培養液」という。)

[0129] 500 ml 容の三角フラスコ30本に上記表2に示す組成の本培養培地を各々80 ml ずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し

、上述の種培養液を無菌的に各4 ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210 rpmの条件下で2日間培養した。この培養液に10 mg/mlの濃度でジメチルスルホキシドに溶解したCDDO-Meの溶液を各々0.8 mlずつ添加し、再度回転振とう培養機で23℃、210 rpmで7日間培養を行った。

[0130] (2) テルペノイド誘導体Hの単離

本実施例におけるテルペノイド誘導体Hの挙動は、以下に示す条件のHPLCでモニターした。

[0131] カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト(株)製)

溶媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流速：1.0 ml/分

温度：40℃

検出：紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：6.0分

[0132] (1)において得られた培養液2400 mlに等量のアセトンを添加し、室温で一晩静置後、菌体を吸引濾過によって取り除き、濾液4500 mlを得た。この濾液を、あらかじめ水で平衡化したダイヤイオンSP207(150 mL：三菱化学(株)製)カラムに付した。カラムを蒸留水：アセトン=5：5の溶媒1000 mlで洗浄した後、蒸留水：アセトン=4：6の溶媒450 mlで溶出し、次いで蒸留水：アセトン=7：3の溶媒900 mlで溶出した。このようにして得られた画分のうち目的化合物が含まれる溶出液を合わせた後濃縮し、次いで凍結乾燥を行うことでテルペノイド誘導体Hを含む抽出物390.6 mgを得た。この粉末をジメチルスルホキシド3.9 mlに溶解し、そのうち0.5 mlをあらかじめ0.01%ギ酸水溶液：

0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45:55の溶媒で平衡化したHPLCカラム(Unison US-C18:直径20mm×長さ150mm:インタクト(株)製)に供与し、0.01%ギ酸水溶液:0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45:55の溶媒で流速18.0ml/分で溶出した。目的化合物の紫外部吸収を波長 $\lambda=230\text{nm}$ にて検出し、保持時間20.0分に現れるピーク(テルペノイド誘導体H)を6回に分けて分取した。分取液をまとめ、減圧濃縮して得られた懸濁液を凍結乾燥し、テルペノイド誘導体Hを無色粉末として14.1mg得た。

[0133] テルペノイド誘導体Hの物理化学的性状の測定値

1) 物質の性状: 無色粉末状物質

2) 分子式:  $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{NO}_6$

3) 分子量: 537 (ESIマスマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスマスペクトル法により測定した精密質量、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ は次に示す通りである。

実測値: 538.31543

計算値: 538.31631

5)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 0.90 (3H, s), 1.00 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.28 (3H, s), 1.22-1.24 (1H, m), 1.23-1.27 (1H, m), 1.30 (3H, s), 1.31-1.34 (1H, m), 1.39-1.41 (1H, m), 1.52-1.55 (1H, m), 1.58-1.60 (1H, m), 1.67-1.70 (1H, m), 1.73-1.78 (1H, m), 1.74-1.76 (1H, m), 1.82 (1H, dd,  $J=5.0\text{Hz}$ ,  $14.0\text{Hz}$ ), 1.90-1.93 (1H, m), 1.93-1.95 (1H, m), 2.01 (1H, dd,  $J=2.0\text{Hz}$ ,  $13.5\text{Hz}$ )

z), 2.99 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.06 (1H, brd, J=13.5 Hz), 3.71 (3H, s), 4.07 (1H, brd, J=5.5 Hz), 4.30 (1H, s), 6.08 (1H, s) ppm  
6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル(125 MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 19.3 (q), 21.7 (q), 22.46 (q), 22.48 (q), 23.1 (t), 23.3 (q), 28.2 (q), 28.8 (t), 30.9 (s), 31.6 (t), 31.8 (d), 33.5 (q), 34.7 (t), 36.2 (t), 39.8 (d), 41.3 (s), 43.5 (s), 45.0 (s), 47.3 (s), 49.7 (d), 51.2 (s), 52.2 (q), 53.4 (s), 69.1 (d), 70.7 (d), 113.6 (s), 125.8 (d), 168.7 (s), 178.3 (s), 198.8 (s), 202.0 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm: インタクト(株)製)

溶媒: A: 0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流速: 1.0 ml/分

温度: 40°C

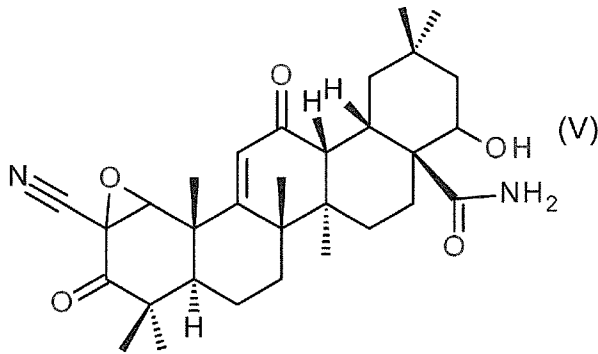
検出: 紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間: 6.0分。

## 実施例 6

[0134] テルペノイド誘導体Eの製造

[化22]



テルペノイド誘導体E

## [0135] (1) ケトミウム属変換菌の培養

100 ml 容の三角フラスコ1本に下記表1に示す組成の種培養培地を20 ml 入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、SANK 10312株の孢子懸濁液を1 ml 接種し、回転振とう培養機で23℃、210 rpmの条件下で2日間培養した。(得られた培養液を、以下、「種培養液」という)。

[0136] 500 ml 容の三角フラスコ1本に上記表2に示す組成の本培養培地を80 ml 入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、上述のSANK 10312株の種培養液を無菌的に4 ml 接種し、回転振とう培養機で23℃、210 rpmの条件下で2日間培養した。この培養液に10 mg/mlの濃度でジメチルスルホキシドに溶解した化合物(IX)の溶液を0.8 ml 添加し、再度回転振とう培養機で23℃、210 rpmで7日間培養を行った。

## [0137] (2) テルペノイド誘導体Eの単離

本実施例におけるテルペノイド誘導体Eの挙動は、以下に示す条件のHPLCでモニターした。

[0138] カラム: Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm: インタクト(株)製)

溶媒: A: 0.01%ギ酸を含む10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸を含むアセトニトリル

A/B = 5/5 で平衡化したのち A/B = 1/9 まで 7 分間の直線グラジエント

流速：1.0 ml/分

温度：40℃

検出：紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：3.2 分（テルペノイド誘導体 E）

[0139] (1) において得られた培養液 80 ml に等量のアセトンを添加し、室温で一晩静置後、菌体を吸引濾過によって取り除き、濾液 150 ml を得た。この濾液に酢酸エチル 80 ml を添加し、液々分配することで目的化合物を含む有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶剤を留去することによって、テルペノイド誘導体 E を含む残渣 62.1 mg を得た。この粉末をジメチルスルホキシド 0.62 ml に溶解し、そのうち 0.3 ml をあらかじめ 0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル = 60：40 の溶媒で平衡化した HPLC カラム（Unison US-C18：直径 20 mm × 長さ 150 mm：インタクト（株）製）に供与し、0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル = 60：40 の溶媒で 20 分間アイソクラティックで展開したのち、0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル = 10：90 の溶媒比まで 20 分間の直線グラジエントで展開し、流速 18.0 ml/分で溶出した。目的化合物の紫外吸収を波長  $\lambda$  = 230 nm にて検出し、保持時間 19.0 分に現れるピーク（テルペノイド誘導体 E）を 2 回に分けて分取した。分取液をまとめ、減圧濃縮して得られた懸濁液を凍結乾燥し、テルペノイド誘導体 E を無色粉末として 0.95 mg 得た。

[0140] テルペノイド誘導体 E の物理化学的性状の測定値

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{31}H_{42}N_2O_5$

3) 分子量：522（ESI マススペクトル法により測定）

4) 高分解能 LC-ESI マススペクトル法により測定した精密質量、[M

+H] +は次に示す通りである。

実測値：5 2 3. 3 1 6 1 6

計算値：5 2 3. 3 1 6 6 5

5)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0. 00 ppmとして測定した $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル (500 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0. 95 (3H, s), 1. 03 (3H, s), 1. 10 (3H, s), 1. 13 (3H, s), 1. 19 (3H, s), 1. 26-1. 30 (1H, m), 1. 28-1. 30 (1H, m), 1. 28 (3H, s), 1. 34 (3H, s), 1. 35 (1H, t,  $J=12. 5\text{ Hz}$ ), 1. 48-1. 52 (1H, m), 1. 57-1. 60 (1H, m), 1. 60-1. 68 (2H, m), 1. 64-1. 68 (1H, m), 1. 65-1. 69 (1H, m), 1. 72-1. 74 (1H, m), 1. 79-1. 81 (1H, m), 1. 97-1. 99 (1H, m), 1. 98-2. 00 (1H, m), 2. 92 (1H, brd,  $J=13. 0\text{ Hz}$ ), 3. 42 (1H, d,  $J=4. 0\text{ Hz}$ ), 3. 90 (1H, brd,  $J=10. 0\text{ Hz}$ ), 4. 34 (1H, s), 6. 08 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0. 00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 17. 4 (t), 18. 3 (t), 21. 4 (q), 21. 5 (q), 22. 8 (q), 24. 0 (q), 24. 2 (q), 27. 7 (t), 28. 0 (q), 31. 1. (s), 31. 4 (t), 31. 8 (d), 33. 2 (q), 35. 6 (t), 40. 9 (s), 42. 58 (d), 42. 62 (s), 43. 8 (t), 45. 1 (s), 45. 8 (s), 49. 2 (d), 51. 6 (s), 53. 3 (s), 69. 1 (d), 71. 0 (d), 113. 6 (s), 124. 8 (d), 168. 7 (s), 178. 7 (s), 198. 8 (s), 202. 3 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6mm×長さ75mm:インタクト(株)製)

溶媒: A: 0.01%ギ酸含有10mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流速: 1.0ml/分

温度: 40℃

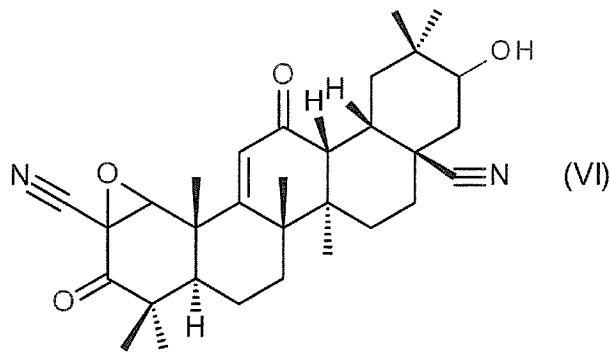
検出: 紫外吸収  $\lambda$  230nm

保持時間: 3.2分。

### 実施例 7

[0141] テルペノイド誘導体Fの製造

[化23]



テルペノイド誘導体F

[0142] (1) ケトミウム属変換菌の培養

100ml容の三角フラスコ10本に上記表1に示す組成の種培養培地を各々20mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、SANK 10312株の孢子懸濁液を1ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。(得られた培養液を、以下、「種培養液」という)。

[0143] 500ml容の三角フラスコ33本に上記表2に示す組成の本培養培地を

各々80mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、上述のSANK 10312株の種培養液を無菌的に各4ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。この培養液に10mg/mlの濃度でジメチルスルホキシドに溶解した化合物(X)の溶液を各々0.8mlずつ添加し、再度回転振とう培養機で23℃、210rpmで3日間培養を行った。

[0144] (2) テルペノイド誘導体Fの単離

本実施例におけるテルペノイド誘導体Fの挙動は、以下に示す条件のHPLCでモニターした。

[0145] カラム：Unison UK-C18

(直径4.6mm×長さ75mm：インタクト(株)製)

溶媒：A：0.01%ギ酸含有10mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流速：1.0ml/分

温度：40℃

検出：紫外吸収  $\lambda$ 230nm

保持時間：4.2分(テルペノイド誘導体F)

[0146] (1)において得られた培養液2500mlに等量のアセトンを追加し、室温で一晩静置後、菌体を吸引濾過によって取り除き、濾液4600mlを得た。この濾液に酢酸エチル2700mlを追加し、液々分配することで目的化合物を含む有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶剤を留去することによって、テルペノイド誘導体Fを含む抽出物762mgを得た。この抽出物をジメチルスルホキシド3.0mlに溶解し、そのうち0.4mlをあらかじめ0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45：55の溶媒で平衡化したHPLCカラム(Unison US-C18：直径20mm×長さ150mm：インタクト(

株) 製) に供与し、0.01%ギ酸水溶液:0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45:55の溶媒で10分間アイソクラティックで展開したのち、0.01%ギ酸水溶液:0.01%ギ酸含有アセトニトリル=10:90の溶媒比まで20分間の直線グラジエントで展開し、流速18.0ml/分で溶出した。目的化合物の紫外部吸収を波長 $\lambda=230\text{nm}$ にて検出し、保持時間12.5分に現れるピーク(テルペノイド誘導体F)を7回に分けて分取した。分取液をまとめ、減圧濃縮して得られた懸濁液を凍結乾燥し、テルペノイド誘導体Fを無色粉末として22.0mg得た。

[0147] テルペノイド誘導体Fの物理化学的性状の測定値

1) 物質の性状: 無色粉末状物質

2) 分子式:  $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$

3) 分子量: 504 (ESIマスマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスマスペクトル法により測定した精密質量、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ は次に示す通りである。

実測値: 505.30551

計算値: 505.30608

5)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル(500MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 0.998 (3H, s), 1.001 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.14 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.30 (1H, t,  $J=13.5\text{Hz}$ ), 1.32 (3H, s), 1.36 (1H, dt,  $J=3.5\text{Hz}, 12.5\text{Hz}$ ), 1.50 (3H, s), 1.54-1.58 (1H, m), 1.64-1.69 (1H, m), 1.68-1.70 (2H, m), 1.70-1.73 (1H, m), 1.74 (1H, dd,  $J=3.5\text{Hz}, 13.5\text{Hz}$ ), 1.97-2.01 (1H, m), 2.00-2.03 (1H, m), 1.99-2.11 (2H, m), 2.07 (1H, brt,  $J=13.5\text{Hz}$ ), 2.80 (1H, dt,  $J=3.5\text{H}$

$z$ , 13.5 Hz), 3.26 (1H, d,  $J=5.0$  Hz), 3.45 (1H, dd,  $J=5.0$  Hz, 12.0 Hz), 4.34 (1H, s), 6.14 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル(125 MHz)は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 16.3 (q), 18.2 (t), 21.36 (q), 21.38 (q), 22.8 (q), 24.3 (q), 25.1 (t), 28.0 (q), 28.3 (t), 29.0 (q), 31.4 (t), 33.7 (d), 35.0 (t), 35.9 (s), 39.5 (t), 39.7 (s), 41.0 (s), 42.1 (s), 42.5 (d), 45.1 (s), 45.8 (s), 49.3 (d), 53.2 (s), 68.9 (d), 72.4 (d), 113.5 (s), 123.5 (s), 124.5 (d), 169.6 (s), 197.5 (s), 202.1 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト(株)製)

溶媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流速：1.0 ml/分

温度：40°C

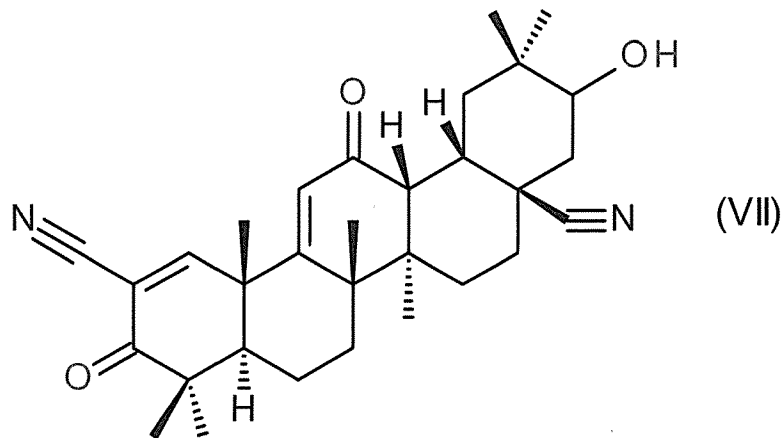
検出：紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：4.2分。

## 実施例 8

[0148] テルペノイド誘導体Gの製造

[化24]



テルペノイド誘導体G

[0149] (1) ケトミウム属変換菌の培養

100ml容の三角フラスコ10本に上記表1に示す組成の種培養培地を各々20mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、SANK 10312株の孢子懸濁液を1ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。(得られた培養液を、以下、「種培養液」という)。

[0150] 500ml容の三角フラスコ33本に上記表2に示す組成の本培養培地を各々80mlずつ入れ、121℃にて20分間滅菌した後、室温まで冷却し、上述のSANK 10312株の種培養液を無菌的に各4ml接種し、回転振とう培養機で23℃、210rpmの条件下で2日間培養した。この培養液に10mg/mlの濃度でジメチルスルホキシドに溶解した化合物(X)の溶液を各々0.8mlずつ添加し、再度回転振とう培養機で23℃、210rpmで3日間培養を行った。

[0151] (2) テルペノイド誘導体Gの単離

本実施例におけるテルペノイド誘導体Gの挙動は、以下に示す条件のHPLCでモニターした。

[0152] カラム: Unison UK-C18

(直径4.6mm×長さ75mm:インタクト(株)製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸含有10mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速：1.0ml/分

温 度：40℃

検 出：紫外部吸収  $\lambda$  230nm

保持時間：3.7分

[0153] (1)において得られた培養液2500mlに等量のアセトンを添加し、室温で一晩静置後、菌体を吸引濾過によって取り除き、濾液4600mlを得た。この濾液に酢酸エチル2700mlを添加し、液々分配することで目的化合物を含む有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶剤を留去することによって、テルペノイド誘導体Gを含む抽出物762mgを得た。この抽出物をジメチルスルホキシド3.0mlに溶解し、そのうち0.4mlをあらかじめ0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45：55の溶媒で平衡化したHPLCカラム（Unison US-C18：直径20mm×長さ150mm：インタクト（株）製）に供与し、0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル=45：55の溶媒で、10分間アイソクラティックで展開したのち、0.01%ギ酸水溶液：0.01%ギ酸含有アセトニトリル=10：90の溶媒比まで20分間の直線グラジエントで展開し、流速18.0ml/分で溶出した。目的化合物の紫外部吸収を波長 $\lambda$ =230nmにて検出し、保持時間9.4分に現れるピーク（テルペノイド誘導体G）を7回に分けて分取した。分取液をまとめ、減圧濃縮して得られた懸濁液を凍結乾燥し、テルペノイド誘導体Gを無色粉末として30.4mg得た。

[0154] テルペノイド誘導体Gの物理化学的性状の測定値

1) 物質の性状：無色粉末状物質

2) 分子式： $C_{31}H_{40}N_2O_3$

3) 分子量 : 488 (ESIマスペクトル法により測定)

4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値 : 489.31073

計算値 : 489.31117

5)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル (500 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.996 (3H, s), 0.997 (3H, s), 0.998 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.27 (3H, s), 1.28 (1H, t,  $J=14.0\text{ Hz}$ ), 1.36 (1H, dt,  $J=2.5\text{ Hz}$ , 13.0 Hz), 1.53 (3H, s), 1.56 (3H, s), 1.60-1.64 (1H, m), 1.63-1.69 (1H, m), 1.70-1.74 (1H, m), 1.71 (1H, dd,  $J=3.5\text{ Hz}$ , 14.0 Hz), 1.78 (1H, dd,  $J=3.0\text{ Hz}$ , 11.0 Hz), 1.82-1.86 (2H, m), 1.99-2.02 (1H, m), 1.99-2.10 (2H, m), 2.08 (1H, brt,  $J=12.0\text{ Hz}$ ), 2.79 (1H, dt,  $J=3.5\text{ Hz}$ , 13.5 Hz), 3.25 (1H, d,  $J=5.0\text{ Hz}$ ), 3.45 (1H, dd,  $J=5.0\text{ Hz}$ , 11.5 Hz), 6.02 (1H, s), 8.03 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 16.3 (q), 18.2 (t), 21.4 (q), 21.5 (q), 24.9 (q), 25.1 (t), 26.7 (q), 27.0 (q), 28.1 (t), 29.0 (q), 31.7 (t), 33.6 (d), 34.9 (t), 35.9 (s), 39.5 (t), 39.6 (s), 42.1 (s), 42.6 (s), 45.0 (s), 45.9 (s), 47.8 (d),

49.3 (d), 72.4 (d), 114.3 (s), 114.7 (s),  
123.5 (s), 123.7 (d), 165.2 (d), 169.4 (s),  
196.3 (s), 197.6 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6mm×長さ75mm:インタクト(株)製)

溶媒: A: 0.01%ギ酸含有10mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジ  
エント

流速: 1.0ml/分

温度: 40℃

検出: 紫外吸収  $\lambda$  230nm

保持時間: 3.7分。

### 試験例 1

[0155] <Nr f 2 標的遺伝子誘導効果 (in vitro) >

Nr f 2 標的遺伝子としてHmox1 遺伝子を用いた。

ARPE-19細胞(ヒト網膜色素上皮細胞株、ATCC社、カタログ番号CRL-2302)に被験化合物を与えることにより誘導されるHmox1 遺伝子の量を測定し、被験化合物によるHmox1 遺伝子の誘導効果を調べた。被験化合物は、実施例1で得られた本発明のテルペノイド誘導体Bと、比較例としてのCDDO-Meである。

ARPE-19細胞を、非働化FBSを10%含むDMEM/F12(ライフテクノロジー社、カタログ番号11330-032)の混合培地を用いて培養した(5%CO<sub>2</sub>、37度)。培地は、終濃度でペニシリンを100単位/mL、ストレプトマイシンを100μg/mL含む。

ARPE-19細胞を60000cells/ウェルとなるように24ウェルプレートに播種した。培地量は500μLである。約24時間後に、実

施例1で得られた本発明のテルペノイド誘導体BあるいはCDDO-Meを含む培地に交換して、培養を継続した。その約6時間後に、抽出用キット（キアゲン社製、RNeasy Mini Kit、カタログ番号74106）を用いて、ARPE-19細胞からmRNAを回収した。得られたmRNAから、cDNA合成キット（GEヘルスケアライフサイエンス社製、First-Strand cDNA Synthesis Kit）を用いてcDNAを作製した。得られたcDNAを試薬（アプライドバイオシステム社製、TaqMan（登録商標） Gene Expression Master Mix（カタログ番号4369016））とプローブを用いて増幅させ、リアルタイム定量PCRをおこなった（アプライドバイオシステムズ社製、Real-time PCR HT7900を使用）。

被験化合物濃度が0 nMのときのHmox1遺伝子発現量を1.0±0.0として、被験化合物の各濃度におけるHmox1遺伝子発現量を、相対値として表した。結果を下記表3に示す。1群は3ウェルで、平均値と標準誤差を示す。

[0156] 表3. Hmox1遺伝子発現量

[表3]

被験化合物濃度 (nM)	CDDO-Me	テルペノイド誘導体B
0	1.0±0.0	1.0±0.0
0.00001	1.1±0.0	1.3±0.0
0.001	1.0±0.1	0.9±0.1
0.03	1.4±0.0	5.4±0.1
0.3	1.4±0.1	6.1±0.5
3	2.1±0.3	10.4±1.5
30	12.2±2.6	20.8±1.9

[0157] この結果を医療統計解析ソフト（グラフパッド社製、プリズム（Ver5））で解析すると、Hmox1遺伝子を2倍および5倍に上昇させる濃度は、CDDO-Meでは2.5 nM及び11 nMであり、本発明のテルペノイド誘導体Bでは0.00091 nM及び0.12 nMであった。本発明のテ

ルペノイド誘導体BのCDDO-Meに対する活性比としては、2747倍および92倍となった。

## 試験例2

### [0158] <細胞保護作用効果>

過酸化物である *tert-butyl hydroperoxide* (t-BHP) は酸化ストレス依存性の細胞障害を引き起こすことが知られている (Chem Biol Interact 2009; 181: 366-、Food Chem Toxicol 2011; 49: 2081-)。

ARPE-19細胞 (ヒト網膜色素上皮細胞株、ATCC社、カタログ番号CRL-2302) にt-BHPを与えることにより引き起こされる生存細胞数の減少が、被験化合物を与えることでどれだけ抑制されるかを測定して、細胞保護作用効果を調べた。被験化合物は、実施例1で得られた本発明のテルペノイド誘導体Bと、比較例としてのCDDO-Meである。

ARPE-19細胞を、非働化FBSを10%含むDMEM/F12 (ライフテクノロジー社、カタログ番号11330-032) の混合培地を用いて培養した (5%CO<sub>2</sub>、37度)。培地は、終濃度でペニシリンを100単位/mL、ストレプトマイシンを100μg/mL含む。

ARPE-19細胞を10000cells/ウェルとなるように96ウェルプレートに播種した。培地量は100μLである。約6時間後に実施例1で得られた本発明のテルペノイド誘導体B或いはCDDO-Meを含む培地に交換して、約16時間培養したのちARPE-19細胞の生存細胞数を測定した (同仁化学研究所製、Cell Counting Kit-8 (カタログ番号CK01) を使用)。その後、t-BHP (シグマアルドリッチ社製、カタログ番号46665) を300μM、含み、さらに、実施例1で得られた本発明のテルペノイド誘導体B又はCDDO-Meを含む培地に交換した。t-BHPを添加してから約6時間後にARPE-19細胞の生存細胞数を測定した。

t-BHPおよび被験化合物を含まない培地における生存細胞数を100

%として、t-BHPを300  $\mu$ M含み被験化合物を各濃度含む培地における生存細胞数を100分率で表した。結果を下記表4に示す。1群は3ウェルで、平均値と標準誤差を示す。

[0159] 表4. 生存細胞数 (100分率)

[表4]

t-BHP ( $\mu$ M)	被験化合物濃度 (nM)	CDDO-Me (%)	テルペノイド誘導体B (%)
0	0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
300	0	61.6 $\pm$ 3.0	61.6 $\pm$ 3.0
300	0.03	61.8 $\pm$ 2.0	90.3 $\pm$ 3.9
300	0.3	56.7 $\pm$ 1.2	99.0 $\pm$ 10.0
300	3	74.3 $\pm$ 1.4	119.7 $\pm$ 5.7
300	30	84.7 $\pm$ 4.8	114.3 $\pm$ 9.5
300	300	76.1 $\pm$ 2.8	111.2 $\pm$ 3.8

[0160] t-BHPの添加で細胞活性は61.6%に低下した。CDDO-Meの添加では生存細胞数の低下は完全に抑制されなかったが、当該化合物の添加では完全に抑制された。

### 試験例3

[0161] <Nrf2標的遺伝子誘導効果 (in vivo)>

Nrf2標的遺伝子としてNqo1遺伝子を用いた。

溶媒に0.5 w/v%メチルセルロース溶液400 cP (和光純薬工業、カタログ番号133-14255)を用いて、実施例1で得られた本発明のテルペノイド誘導体B、CDDO-Meそれぞれの懸濁液を調製した。C57Black6マウス(日本チャールス・リバー、雄性、8週齢入荷、実験開始時は10週齢)に、投与容量を10 mL/kgとし、1、3、10 mg/kgの用量で、1日1回、12日間連続で経口投与した。最終投与の翌日にマウスを安楽死させ、腎臓を採材した。抽出用キット(キアゲン社製、RNeasy Mini Kit、カタログ番号74106)を用いて、採材した腎臓からmRNAを回収した。得られたmRNAから、cDNA合成キット(GEヘルスケアライフサイエンス社製、First-Strand

cDNA Synthesis Kit) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA を試薬 (アプライドバイオシステム社製、TaqMan (登録商標) Gene Expression Master Mix (カタログ番号 4369016)) とプローブを用いて増幅させ、リアルタイム定量 PCR をおこなった (アプライドバイオシステムズ社製、Real-time PCR HT7900 を使用)。溶媒のみを投与した群の腎臓の Nqo1 遺伝子発現量を 1 とした時の誘導結果を表 5 に示す。なお、1 群は 6 匹で、平均値と標準誤差を示す。

[0162] 表 5. Nqo1 遺伝子発現量

[表5]

用量 (mg/kg)	CDDO-Me	テルペノイド誘導体 B
0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
1	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1
3	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.2
10	1.0 ± 0.1	2.3 ± 0.2

[0163] 実施例 1 で得られた本発明のテルペノイド誘導体 B は、1 mg/kg の用量から Nqo1 遺伝子の誘導が認められたが、CDDO-Me では、Nqo1 遺伝子の誘導は認められなかった。

#### 試験例 4

[0164] <細胞傷害性>

ARPE-19 細胞 (ヒト網膜色素上皮細胞株、ATCC 社、カタログ番号 CRL-2302) を培養した (5% CO<sub>2</sub>、37 度)。非働化 FBS を 10% 含む DMEM/F12 (ライフテクノロジー社、カタログ番号 11330-032) の混合培地を用いた。また、培地は終濃度でペニシリンを 100 単位/mL、ストレプトマイシンを 100 ug/mg 含んでいた。

ARPE-19 細胞を 5000 cells/ウェルとなるように 96 ウェルプレートに播種した。培地量は 50 uL である。約 3 時間後に CDDO-Me あるいはテルペノイド誘導体 A~H を含む培地を 50 uL 添加して、約

16時間培養した。その後、細胞傷害性をLDH-Cytotoxic Test（和光純薬工業、カタログ番号299-50601）を用いて評価した。評価方法は添付文書に従った。1群は3ウェルで、濃度10 $\mu$ M時の細胞傷害性を示した。その平均値は、CDDO-Meが43%、テルペノイド誘導体Aが2%、テルペノイド誘導体Bが2%、テルペノイド誘導体Cが2%、テルペノイド誘導体Dが1%、テルペノイド誘導体Eが2%、テルペノイド誘導体Fが3%、テルペノイド誘導体Gが3%、テルペノイド誘導体Hが1%、であった。CDDO-Meと比較して、テルペノイド誘導体A~Hでは細胞傷害性が低かった。

### 試験例5

#### [0165] <NQO1アッセイ>

Hepa1c1c7細胞（マウス肝細胞株、ATCC社、カタログ番号CRL-2026）を培養した（5%CO<sub>2</sub>、37度）。非働化FBSを10%含むDMEM（ライフテクノロジー社、カタログ番号11965-092）の培地を用いた。また、培地は終濃度でペニシリンを100単位/mL、ストレプトマイシンを100 $\mu$ g/mg含む。NQO1アッセイは既報に従って（Anal Biochem 1998； 169： 328-、Methods Enzymol 2004； 382： 243-）、実施した。

Hepa1c1c7細胞を10000cells/ウェルとなるように96ウェルプレートに播種した。培地量は100 $\mu$ Lである。約24時間後にCDDO-Meあるいはテルペノイド誘導体A~Gを含む培地に交換して、更に約48時間培養した。溶解液（EDTAを2mM、ジギトニンを0.8%含む溶液）、反応溶液（トリス塩酸を0.025M、アルブミンを0.067%、Tween-20を0.01%、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを2U/mL、フラビンアデニンジヌクレオチドを5 $\mu$ M、グルコース-6-リン酸を1 $\mu$ M、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を30 $\mu$ M、3-（4、5-ジメチル-2-チアゾリル）-2、5-ジフェ

ニルテトラゾリウムブロミド (MTT) を 0.03%、メナジオンを 50  $\mu$ M 含む溶液)、停止液 (ジクマロールを 0.3 mM、リン酸 2 水素カリウムを 5 mM 含む溶液、pH は 7.4) を調製した。培地を除去後、溶解液を 50  $\mu$ L 添加して、37 度で 10 分間静置した。さらに、室温で 10 分間振盪させた。

[0166] 溶液を 200  $\mu$ L 添加して、室温で 5 分間静置した。停止液を 50  $\mu$ L 添加して、490 nm の吸光度を測定した。

試験結果をグラフパッド社のプリズム (Ver 5) で解析して、NQO1 の活性を 2 倍に上昇させる濃度の CD 値を算出した。1 群は 3 ウェルで、CD 値はその平均値である。

CD 値は、CDDO-Me が 1.0 nM、テルペノイド誘導体 A が 1.3 nM、テルペノイド誘導体 B が 0.3 nM、テルペノイド誘導体 C が 0.4 nM、テルペノイド誘導体 D が 0.9 nM、テルペノイド誘導体 E が 2.1 nM、テルペノイド誘導体 F が 0.1 nM、テルペノイド誘導体 G が 0.1 nM であった。

## 試験例 6

[0167] <ラット酸素誘発網膜症に対する抑制効果 (in vivo)>

SD ラット新生児 (日本チャールス・リバー、妊娠ラットを入荷) を実験に用いた。1 日齢から 12 日齢の間、新生児を母親ラットとともに約 80% の酸素下で飼育した。13 日齢からは大気下で飼育した。溶媒に 0.5 w/v% メチルセルロース溶液 400 cP (和光純薬工業、カタログ番号 133-14255) を用いて、テルペノイド誘導体 B の懸濁液を調製した。投与容量は 10 mL/kg とし、0.03、0.1、0.3 mpk の用量で、1 日 1 回、11 日齢から 17 日齢の間の計 7 回経口投与した。最終投与の翌日に新生児ラットを安楽死させ、網膜を採材した。文献 (Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41: 887-) に従って、網膜の病態をスコア化した。結果を表 6 に示す。1 群は 14-30 眼で、平均値と標準誤差を示す。

[0168] 表6. ラット酸素誘発網膜症における網膜の病態

[表6]

酸素負荷	用量 (mg/kg)	テルペノイド誘導体Bのスコア
無	0	0.00 ± 0.00
有	0	4.00 ± 0.44
有	0.03	3.93 ± 0.79
有	0.1	3.54 ± 0.48
有	0.3	2.57 ± 0.35

テルペノイド誘導体Bは用量依存的に網膜病態スコアを抑制した。

### 製剤例 1

[0169] <錠剤>

本発明のテルペノイド誘導体B	30mg
乳糖	118mg
トウモロコシ澱粉	50mg
ステアリン酸マグネシウム	2mg
全量	200mg

### 製剤例 2

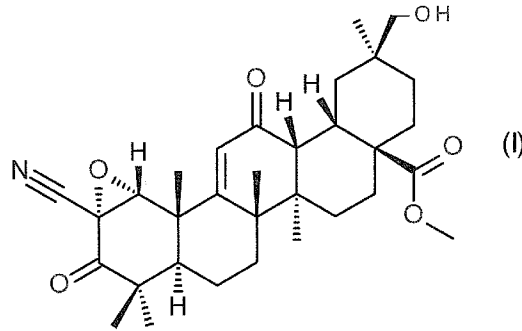
[0170] <点眼剤>

本発明のテルペノイド誘導体B	300mg
リン酸二水素ナトリウム (pH調整剤)	1ml
塩化ナトリウム	適量
滅菌精製水	適量
全量	100ml

## 請求の範囲

[請求項1] 下記式 (I) :

[化1]



で表されるテルペノイド誘導体。

[請求項2] 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

- 1) 物質の性状：無色粉末状物質
- 2) 分子式： $C_{32}H_{43}NO_6$
- 3) 分子量：537 (ESIマスペクトル法により測定)
- 4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値：538.31549

計算値：538.31631

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル (500MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.92 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.12 (3H, s), 1.14-1.17 (1H, m), 1.19 (3H, s), 1.22-1.24 (1H, m), 1.18-1.25 (1H, m), 1.28 (3H, s), 1.28 (3H, s), 1.46-1.48 (1H, m), 1.48-1.52 (1H, m), 1.50-1.54 (1H, m), 1.59-1.67 (2H, m), 1.62-1.66 (1H, m), 1.64-1.67 (1H, m), 1.75 (

1 H, d,  $J = 13.5$  Hz), 1.80–1.83 (1 H, m),  
1.85–1.87 (2 H, m), 1.98 (1 H, dd,  $J = 9.0$   
Hz, 4.5 Hz), 2.95 (1 H, s), 2.98 (1 H, b  
r s), 3.45 (1 H, d,  $J = 11.5$  Hz), 3.70 (3 H  
, s), 3.73 (1 H, d,  $J = 11.5$  Hz), 4.34 (1 H  
, s), 6.11 (1 H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシ  
グナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクト  
ル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 18.5 (t), 21.1 (q), 21.6 (q), 23.0 (q),  
24.0 (q), 24.1 (t), 27.3 (q), 28.2  
(q), 28.6 (t), 29.6 (t), 31.0 (d), 31.  
5 (t), 31.6 (t), 32.4 (t), 35.7 (s), 41.  
.2 (s), 42.3 (s), 42.8 (d), 45.3 (s), 4  
5.8 (s), 47.1 (s), 49.6 (d), 52.3 (q),  
53.5 (s), 67.6 (t), 69.3 (d), 113.7 (s  
) , 124.8 (d), 169.8 (s), 178.0 (s), 19  
9.6 (s), 202.5 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト (株) 製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B = 45/55 のアイソクラティック

流 速：1.0 ml/分

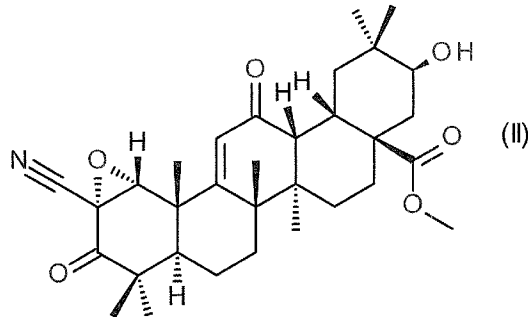
温 度：40°C

検 出：紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：5.8分。

[請求項3] 下記式 ( I I )

[化2]



で表されるテルペノイド誘導体。

[請求項4] 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

- 1) 物質の性状：無色粉末状物質
- 2) 分子式： $C_{32}H_{43}NO_6$
- 3) 分子量：537 (ESIマスペクトル法により測定)
- 4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値：538.31573

計算値：538.31631

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル (500MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.99 (3H, s), 0.99 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.12 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.19-1.22 (1H, m), 1.27 (3H, s), 1.27 (3H, s), 1.29-1.35 (2H, m), 1.45-1.49 (1H, m), 1.62-1.66 (1H, m), 1.58-1.67 (2H, m), 1.64-1.69 (1H, m), 1.72-1.75 (1H, m), 1.69-1.79 (1H, m), 1.88 (2H, dd)

, J = 10.0 Hz, 3.0 Hz), 1.96 (1H, dd, J = 10.0 Hz, 4.5 Hz), 2.97 (1H, s), 3.04 (1H, dd, J = 10.0 Hz, 4.5 Hz), 3.49 (1H, dd, J = 11.5 Hz, 5.0 Hz), 3.70 (3H, s), 4.34 (1H, s), 6.08 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 16.6 (q), 18.5 (t), 21.6 (q $\times$ 2), 23.0 (q), 24.0 (q), 24.1 (t), 28.2 (q), 28.4 (t), 29.3 (q), 31.3 (d), 31.6 (d), 36.1 (t), 36.2 (s), 40.4 (t), 41.1 (s), 42.2 (s), 42.8 (d), 45.3 (s), 45.8 (s), 49.1 (s), 49.3 (d), 52.3 (s), 53.4 (s), 69.2 (d), 73.9 (t), 113.7 (s), 125.0 (d), 168.9 (s), 176.8 (s), 198.9 (s), 202.5 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6 mm $\times$ 長さ75 mm: インタクト (株) 製)

溶媒: A: 0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B = 45/55のアイソクラティック

流速: 1.0 ml/分

温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

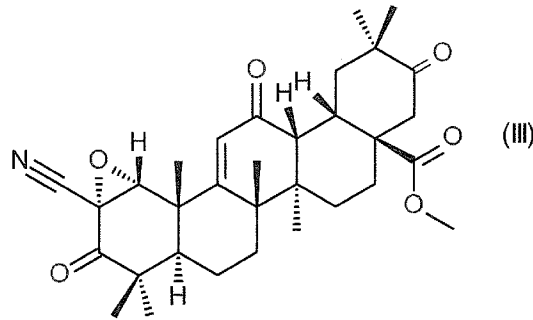
検出: 紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間: 3.8分。

[請求項5]

下記式 ( I I I )

[化3]



で表されるテルペノイド誘導体。

[請求項6]

下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

- 1) 物質の性状：無色粉末状物質
- 2) 分子式： $C_{32}H_{41}NO_6$
- 3) 分子量：535（ESIマスペクトル法により測定）
- 4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値：536.30023

計算値：536.30066

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル（500MHz）は、以下に示す通りである。

$\sigma$ ：1.04（3H, s），1.05（3H, s），1.13（3H, s），1.19（3H, s），1.20-1.26（1H, m），1.30（m, 3H），1.29（3H, s），1.33（3H, s），1.47-1.50（1H, m），1.63-1.68（2H, m），1.59-1.68（2H, m），1.65-1.67（1H, m），1.64-1.73（2H, m），1.71（1H, d,  $J=13.5\text{ Hz}$ ），1.98（1H, d,  $J=13.5\text{ Hz}$ ），2.03（1H, dd,  $J=14.0\text{ Hz}$ ,  $3.5\text{ Hz}$ ），2.27（1H, d,  $J=14.5\text{ Hz}$ ），2.85（1H, d,  $J=14.5\text{ Hz}$ ）

z), 3.05 (1H, d, J=4.5 Hz), 3.38 (1H, br d, J=13.5 Hz), 3.74 (3H, s), 4.34 (1H, s), 6.12 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 18.4 (t), 21.6 (q $\times$ 2), 23.0 (q), 24.1 (q $\times$ 2), 25.5 (q), 25.6 (t), 28.2 (q), 28.3 (t), 31.5 (t), 31.7 (d), 37.4 (t), 41.2 (s), 42.1 (s), 42.8 (d), 45.3 (s), 45.6 (s), 45.9 (s), 47.0 (t), 49.1 (d), 51.1 (s), 52.7 (q), 53.4 (s), 69.2 (d), 113.7 (s), 124.8 (d), 169.4 (s), 175.5 (s), 198.5 (s), 202.4 (s), 213.4 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6 mm $\times$ 長さ75 mm: インタクト (株) 製)

溶媒: A: 0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=45/55 のアイソクラティック

流速: 1.0 ml/分

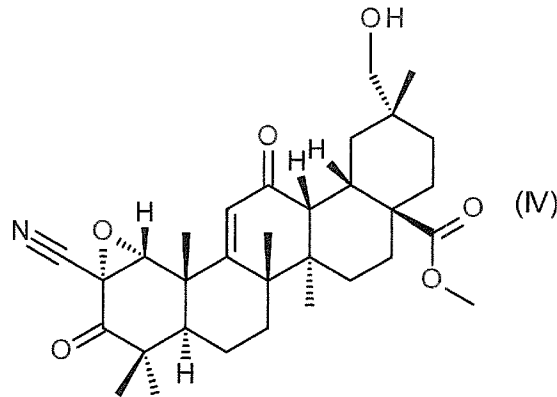
温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

検出: 紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間: 6.2分。

[請求項7] 下記式 (I V) :

[化4]



で表されるテルペノイド誘導体。

[請求項8]

下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

- 1) 物質の性状：無色粉末状物質
- 2) 分子式： $C_{32}H_{43}NO_6$
- 3) 分子量：537 (ESIマスペクトル法により測定)
- 4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値：538.31592

計算値：538.31631

- 5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル (500 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 1.05 (3H, s), 1.11 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.25-1.27 (1H, m), 1.27-1.29 (1H, m), 1.30 (3H, s), 1.30 (3H, s), 1.40 (1H, brt,  $J=13.0$  Hz), 1.48-1.52 (1H, m), 1.50-1.54 (1H, m), 1.58-1.60 (1H, m), 1.60-1.63 (1H, m), 1.62-1.71 (2H, m), 1.66-1.70 (1H, m), 1.69-1.73 (1H, m), 1.76-1.82 (1H, m)

), 1.90–1.94 (1H, m), 1.93–1.99 (1H, m), 2.01 (1H, dd,  $J=4.5$  Hz, 10.0 Hz), 3.02 (1H, d,  $J=4.5$  Hz), 3.12 (1H, dt,  $J=3.5$  Hz, 13.5 Hz), 3.32 (3H, s), 3.74 (3H, s), 4.36 (1H, s), 6.11 (1H, s) ppm  
6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル: 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 18.3 (t), 18.7 (q), 21.4 (q), 21.5 (q), 22.7 (t), 22.8 (q), 23.9 (q), 28.0 (q), 28.2 (t), 28.7 (t), 30.1 (t), 30.8 (d), 31.4 (t), 32.0 (t), 35.8 (s), 40.9 (s), 42.0 (s), 42.5 (d), 45.1 (s), 45.6 (s), 47.4 (s), 49.6 (d), 52.0 (q), 53.2 (s), 69.1 (d), 74.2 (t), 113.6 (s), 124.8 (d), 168.7 (s), 178.0 (s), 198.7 (s), 202.4 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー:

カラム: Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm: インタクト (株) 製)

溶媒: A: 0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B: 0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流速: 1.0 ml/分

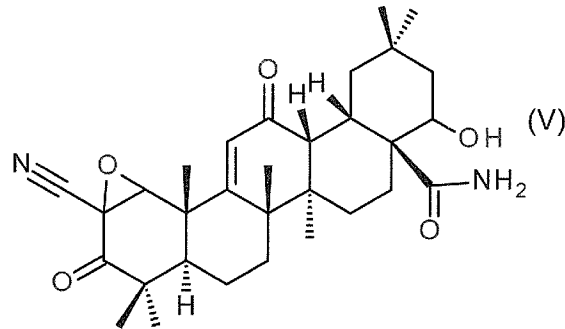
温度: 40°C

検出: 紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間: 5.2分。

[請求項9] 下記式 (V) :

[化5]



で表されるテルペノイド誘導体。

[請求項10] 下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体 :

- 1) 物質の性状 : 無色粉末状物質
- 2) 分子式 :  $C_{31}H_{42}N_2O_5$
- 3) 分子量 : 522 (ESIマスペクトル法により測定)
- 4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値 : 523.31616

計算値 : 523.31665

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル (500MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$  : 0.95 (3H, s), 1.03 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.26-1.30 (1H, m), 1.28-1.30 (1H, m), 1.28 (3H, s), 1.34 (3H, s), 1.35 (1H, t,  $J=12.5$  Hz), 1.48-1.52 (1H, m), 1.57-1.60 (1H, m), 1.60-1.68 (2H, m), 1.64-1.68 (1H, m), 1.65-1.69 (1H, m), 1.72-1.74 (1H, m), 1.79-1.81 (1H, m), 1.97-

1. 99 (1H, m), 1. 98–2. 00 (1H, m), 2. 92 (1H, brd, J=13. 0 Hz), 3. 42 (1H, d, J=4. 0 Hz), 3. 90 (1H, brd, J=10. 0 Hz), 4. 34 (1H, s), 6. 08 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0. 00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 17. 4 (t), 18. 3 (t), 21. 4 (q), 21. 5 (q), 22. 8 (q), 24. 0 (q), 24. 2 (q), 27. 7 (t), 28. 0 (q), 31. 1. (s), 31. 4 (t), 31. 8 (d), 33. 2 (q), 35. 6 (t), 40. 9 (s), 42. 58 (d), 42. 62 (s), 43. 8 (t), 45. 1 (s), 45. 8 (s), 49. 2 (d), 51. 6 (s), 53. 3 (s), 69. 1 (d), 71. 0 (d), 113. 6 (s), 124. 8 (d), 168. 7 (s), 178. 7 (s), 198. 8 (s), 202. 3 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4. 6 mm×長さ75 mm：インタクト (株) 製)

溶 媒：A：0. 01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0. 01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速：1. 0 ml/分

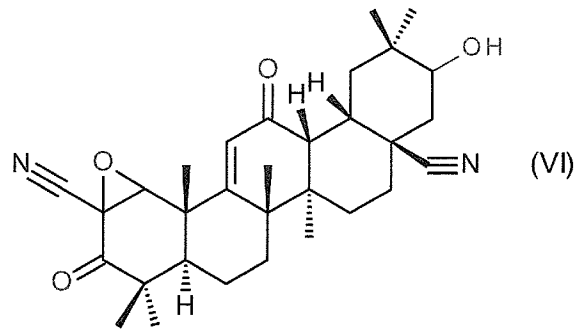
温 度：40℃

検 出：紫外吸収  $\lambda$  230 nm

保持時間：3. 2分。

[請求項11] 下記式 (V I)：

[化6]



で表されるテルペノイド誘導体。

[請求項12]

下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

- 1) 物質の性状：無色粉末状物質
- 2) 分子式： $C_{31}H_{40}N_2O_4$
- 3) 分子量：504（ESIマスペクトル法により測定）
- 4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値：505.30551

計算値：505.30608

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル（500MHz）は、以下に示す通りである。

$\sigma$ ：0.998 (3H, s), 1.001 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.14 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.30 (1H, t,  $J=13.5$  Hz), 1.32 (3H, s), 1.36 (1H, dt,  $J=3.5$  Hz, 12.5 Hz), 1.50 (3H, s), 1.54-1.58 (1H, m), 1.64-1.69 (1H, m), 1.68-1.70 (2H, m), 1.70-1.73 (1H, m), 1.74 (1H, dd,  $J=3.5$  Hz, 13.5 Hz), 1.97-2.01 (1H, m), 2.00-2.03 (1H, m), 1.99-2.11 (2H, m), 2.07 (1H, brt,

$J = 13.5 \text{ Hz}$ ),  $2.80$  (1H, dt,  $J = 3.5 \text{ Hz}$ ,  $13.5 \text{ Hz}$ ),  $3.26$  (1H, d,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ ),  $3.45$  (1H, dd,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ ,  $12.0 \text{ Hz}$ ),  $4.34$  (1H, s),  $6.14$  (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを $0.00$  ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル ( $125 \text{ MHz}$ ) は、以下に示す通りである。

$\sigma$ :  $16.3$  (q),  $18.2$  (t),  $21.36$  (q),  $21.38$  (q),  $22.8$  (q),  $24.3$  (q),  $25.1$  (t),  $28.0$  (q),  $28.3$  (t),  $29.0$  (q),  $31.4$  (t),  $33.7$  (d),  $35.0$  (t),  $35.9$  (s),  $39.5$  (t),  $39.7$  (s),  $41.0$  (s),  $42.1$  (s),  $42.5$  (d),  $45.1$  (s),  $45.8$  (s),  $49.3$  (d),  $53.2$  (s),  $68.9$  (d),  $72.4$  (d),  $113.5$  (s),  $123.5$  (s),  $124.5$  (d),  $169.6$  (s),  $197.5$  (s),  $202.1$  (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径 $4.6 \text{ mm}$ ×長さ $75 \text{ mm}$ ：インタクト (株) 製)

溶 媒：A： $0.01\%$ ギ酸含有 $10 \text{ mM}$ ギ酸アンモニウム水溶液

B： $0.01\%$ ギ酸含有アセトニトリル

A/B =  $5/5$ で平衡化したのちA/B =  $1/9$ まで7分間の直線グラジエント

流 速： $1.0 \text{ ml/分}$

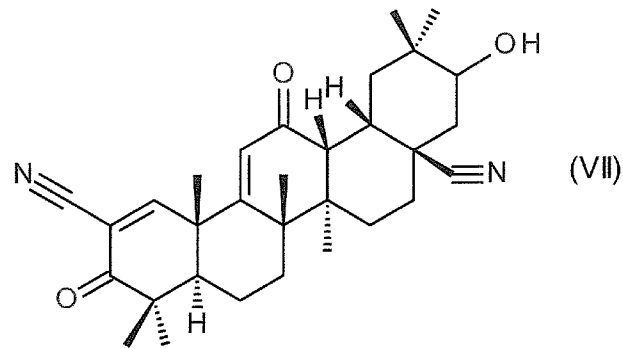
温 度： $40^\circ\text{C}$

検 出：紫外吸収  $\lambda 230 \text{ nm}$

保持時間： $4.2$ 分。

[請求項13] 下記式 (V I I)：

[化7]



で表されるテルペノイド誘導体。

[請求項14]

下記の物理化学的性状を有するテルペノイド誘導体：

- 1) 物質の性状：無色粉末状物質
- 2) 分子式： $C_{31}H_{40}N_2O_3$
- 3) 分子量：488（ESIマスペクトル法により測定）
- 4) 高分解能LC-ESIマスペクトル法により測定した精密質量、 $[M+H]^+$ は次に示す通りである。

実測値：489.31073

計算値：489.31117

5)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00ppmとして測定した $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル（500MHz）は、以下に示す通りである。

$\sigma$ ：0.996（3H, s）, 0.997（3H, s）, 0.998（3H, s）, 1.19（3H, s）, 1.27（3H, s）, 1.28（1H, t,  $J=14.0\text{Hz}$ ）, 1.36（1H, dt,  $J=2.5\text{Hz}, 13.0\text{Hz}$ ）, 1.53（3H, s）, 1.56（3H, s）, 1.60-1.64（1H, m）, 1.63-1.69（1H, m）, 1.70-1.74（1H, m）, 1.71（1H, dd,  $J=3.5\text{Hz}, 14.0\text{Hz}$ ）, 1.78（1H, dd,  $J=3.0\text{Hz}, 11.0\text{Hz}$ ）, 1.82-1.86（2H, m）, 1.99-2.02（1H, m）, 1.99-2.10（2H, m）,

2.08 (1H, brt,  $J=12.0\text{ Hz}$ ), 2.79 (1H, dt,  $J=3.5\text{ Hz}$ ,  $13.5\text{ Hz}$ ), 3.25 (1H, d,  $J=5.0\text{ Hz}$ ), 3.45 (1H, dd,  $J=5.0\text{ Hz}$ ,  $11.5\text{ Hz}$ ), 6.02 (1H, s), 8.03 (1H, s) ppm

6)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中でTMSのシグナルを0.00 ppmとして測定した $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (125 MHz) は、以下に示す通りである。

$\sigma$ : 16.3 (q), 18.2 (t), 21.4 (q), 21.5 (q), 24.9 (q), 25.1 (t), 26.7 (q), 27.0 (q), 28.1 (t), 29.0 (q), 31.7 (t), 33.6 (d), 34.9 (t), 35.9 (s), 39.5 (t), 39.6 (s), 42.1 (s), 42.6 (s), 45.0 (s), 45.9 (s), 47.8 (d), 49.3 (d), 72.4 (d), 114.3 (s), 114.7 (s), 123.5 (s), 123.7 (d), 165.2 (d), 169.4 (s), 196.3 (s), 197.6 (s) ppm

7) 高速液体クロマトグラフィー：

カラム：Unison UK-C18

(直径4.6 mm×長さ75 mm：インタクト (株) 製)

溶 媒：A：0.01%ギ酸含有10 mMギ酸アンモニウム水溶液

B：0.01%ギ酸含有アセトニトリル

A/B=5/5で平衡化したのちA/B=1/9まで7分間の直線グラジエント

流 速：1.0 ml/分

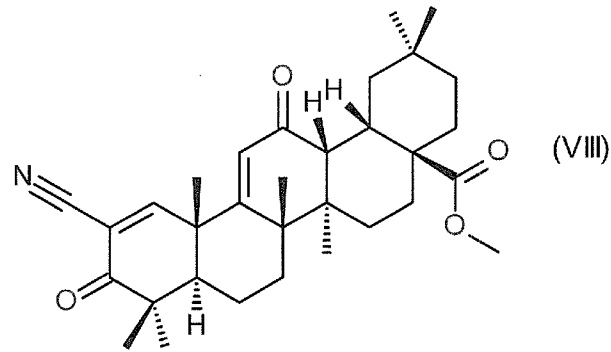
温 度：40℃

検 出：紫外吸収  $\lambda 230\text{ nm}$

保持時間：3.7分。

[請求項15] 下記式 (V I I I)：

[化8]



で表される化合物を基質とし、このものを請求項1、2、7乃至8のいずれか1項に記載の化合物に変換しうるカニングハメラ属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より請求項1、2、7乃至8のいずれか1項に記載の化合物を採取することを特徴とする、請求項1、2、7乃至8のいずれか1項に記載の化合物の製造方法。

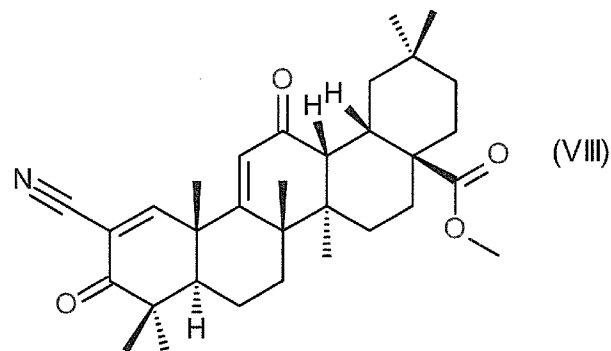
[請求項16]

変換菌が、カニングハメラ属に属するカニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*) SANK 10412株 (受託番号NITE BP-1487) である、請求項15に記載の化合物の製造方法。

[請求項17]

下記式 (VIII) :

[化9]



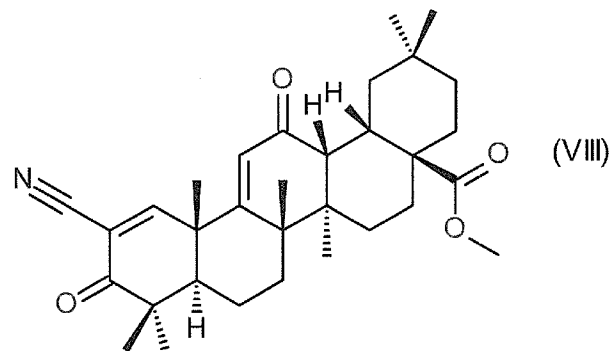
で表される化合物を基質とし、このものを請求項3乃至6のいずれか1項に記載の化合物に変換しうるケトミウム属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より請求項3乃至6のいずれか1項に記載

載の化合物を採取することを特徴とする、請求項3乃至6のいずれか1項に記載の化合物の製造方法。

[請求項18] 変換菌がケトミウム属に属するケトミウム・グロボーサム (*Chaetomium globosum*) SANK 10312株(受託番号NITE BP-1486)である、請求項19に記載の製造方法。

[請求項19] 下記式 (VIII) :

[化10]

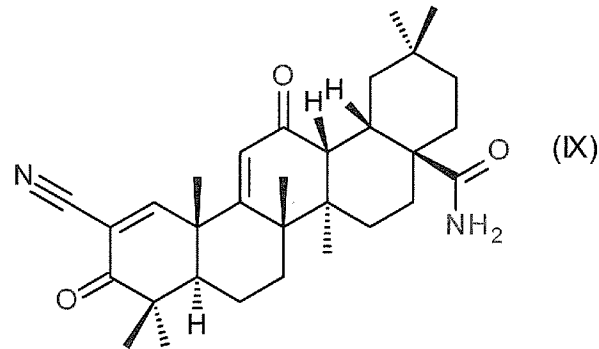


で表される化合物を基質とし、このものを請求項3乃至6のいずれか1項に記載の化合物に変換しうるムコール属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より請求項3乃至6のいずれか1項に記載の化合物を採取することを特徴とする、請求項3乃至6のいずれか1項に記載の化合物の製造方法。

[請求項20] 変換菌が、ムコール属に属するムコール・ヒエマリス・エフ・ヒエマリス (*Mucor hiemalis* f. *hiemalis*) SANK 10612株(受託番号NITE BP-1488)である、請求項21に記載の製造方法。

[請求項21] 下記式 (IX) :

[化11]

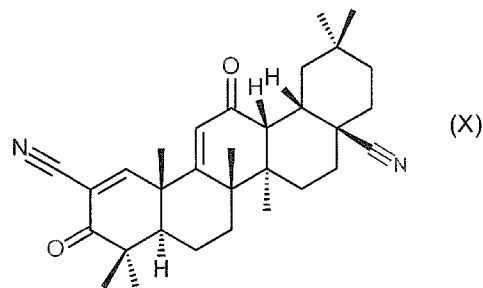


で表される化合物を基質とし、このものを請求項9又は10に記載の化合物に変換しうるケトミウム属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より請求項9又は10に記載の化合物を採取することを特徴とする、請求項9又は10に記載の化合物の製造方法。

[請求項22]

下記式 (X) :

[化12]



で表される化合物を基質とし、このものを請求項11乃至14のいずれか1項に記載の化合物に変換しうるケトミウム属に属する変換菌と共に培地中で培養し、その培養物より請求項11乃至14のいずれか1項に記載の化合物を採取することを特徴とする、請求項11乃至14のいずれか1項に記載の化合物の製造方法。

[請求項23]

カニングハメラ属に属するカニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*) SANK 10412株 (受託番号NITE BP-1487)。

[請求項24]

ケトミウム属に属するケトミウム・グロボーサム (*Chaetomium*

ium globosum) SANK 10312株(受託番号NITE BP-1486)。

[請求項25] ムコール属に属するムコール・ヒエマリス・エフ・ヒエマリス (Mucor hiemalis f. hiemalis) SANK 10612株 (受託番号NITE BP-1488)。

[請求項26] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する医薬。

[請求項27] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する

眼疾患 (当該眼疾患は、アレルギー性結膜疾患、ウィルス性結膜炎、翼状片、角膜感染症、ドライアイ、角膜障害 (角膜上皮障害、及び/又は、角膜内皮障害である)、ぶどう膜炎、ベーチェット病、糖尿病網膜症、網膜剥離、網膜静脈閉塞、中心性漿液性脈絡網膜症、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑浮腫、黄斑疾患、網膜色素変性、緑内障、若しくは、白内障である)、

腎疾患 (当該腎疾患は、急性腎炎、慢性腎炎、急性腎不全、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、IgA腎症、糖尿病腎症、痛風腎、腎硬化症、水腎症、尿細管間質性腎炎、冠動脈バイパス手術後の腎機能低下、若しくは、腎尿路感染症である)、

呼吸器疾患 (当該呼吸器疾患は、気管支炎、肺炎、胸膜炎、慢性閉塞性肺疾患、急性肺障害 (acute lung injury: ALI)、びまん性汎細気管支炎、肺気腫、若しくは、喘息である)、

肝疾患 (当該肝疾患は、アルコール性脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症、肝硬変、若しくは、肝移植に伴う肝機能障害である)、

脳疾患 (当該脳疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lat

eral sclerosis: ALS)、脳梗塞、若しくは、多発性硬化症 (multiple sclerosis) である)、又は

心臓疾患 (当該心臓疾患は、心筋梗塞である)

の予防剤又は治療剤。

[請求項28] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する

眼疾患 (当該眼疾患は、ドライアイ、角膜障害 (角膜上皮障害、及び/又は、角膜内皮障害である)、ぶどう膜炎、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑浮腫、若しくは、緑内障である)、

腎疾患 (当該腎疾患は、糖尿病腎症である)、

呼吸器疾患 (当該呼吸器疾患は、慢性閉塞性肺疾患、若しくは、急性肺障害である)、

肝疾患 (当該肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変、若しくは、肝移植に伴う肝機能障害である)、又は

脳疾患 (当該脳疾患は、脳梗塞、若しくは、多発性硬化症である) の予防剤又は治療剤。

[請求項29] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有するドライアイの予防又は治療剤。

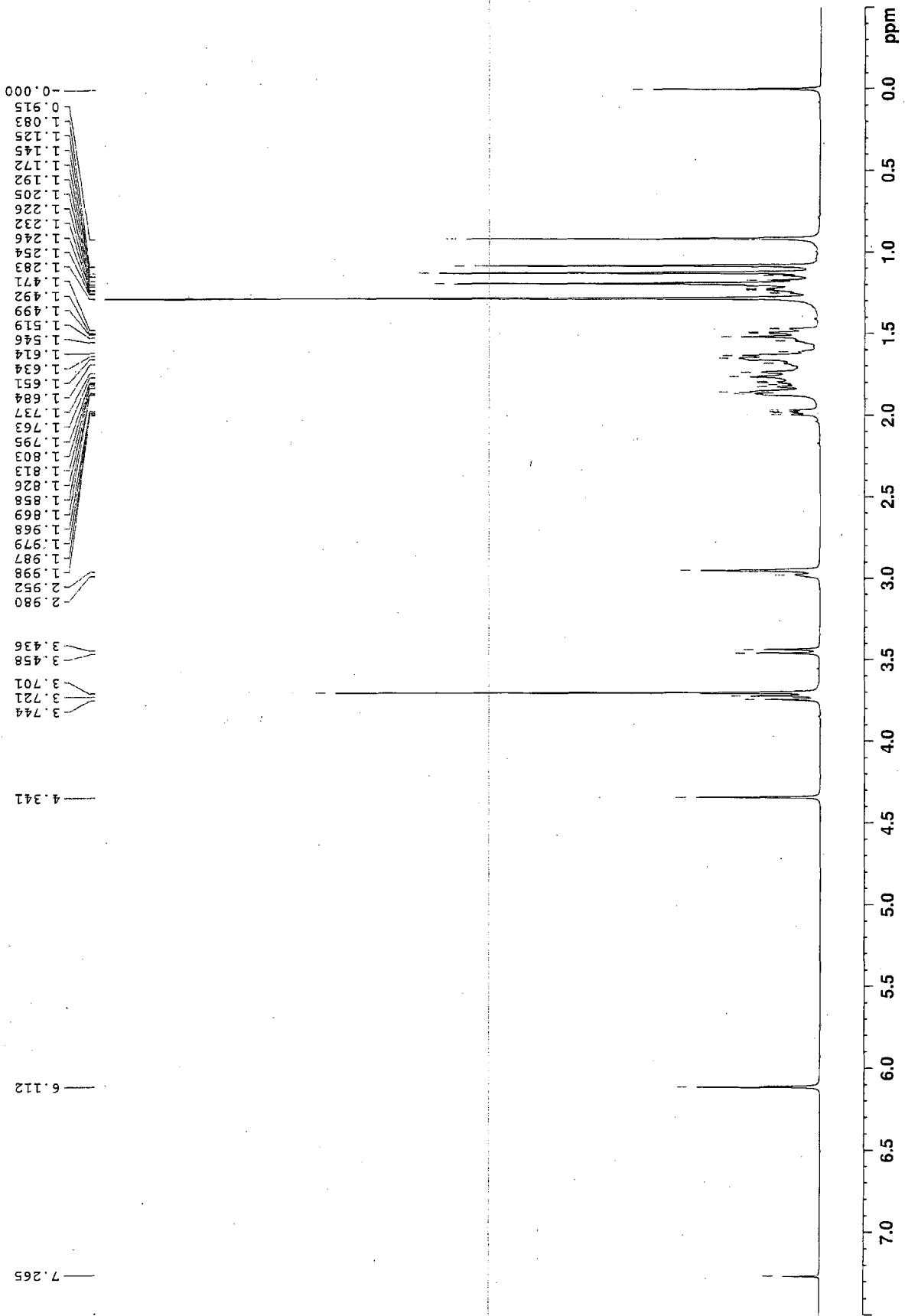
[請求項30] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する角膜上皮、及び/又は、角膜内皮の障害の予防又は治療剤。

[請求項31] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する加齢黄斑変性の予防又は治療剤。

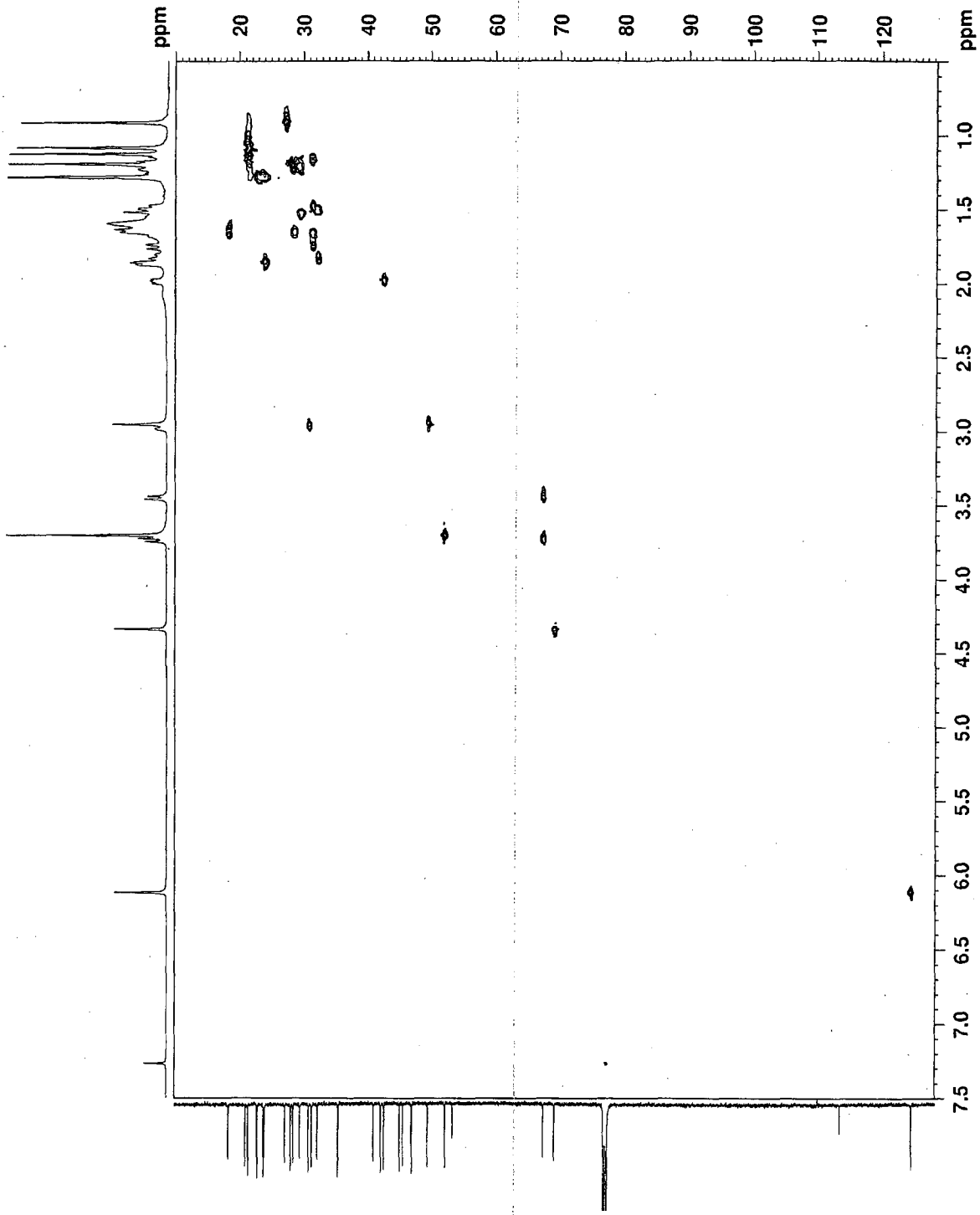
[請求項32] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する糖尿病黄斑浮腫、及び/又は、網膜静脈閉塞の予防又は治療剤。

- [請求項33] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤。
- [請求項34] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する脳梗塞の予防又は治療剤。
- [請求項35] 請求項1乃至14のいずれか1項に記載されたテルペノイド誘導体を有効成分として含有する多発性硬化症の予防又は治療剤。

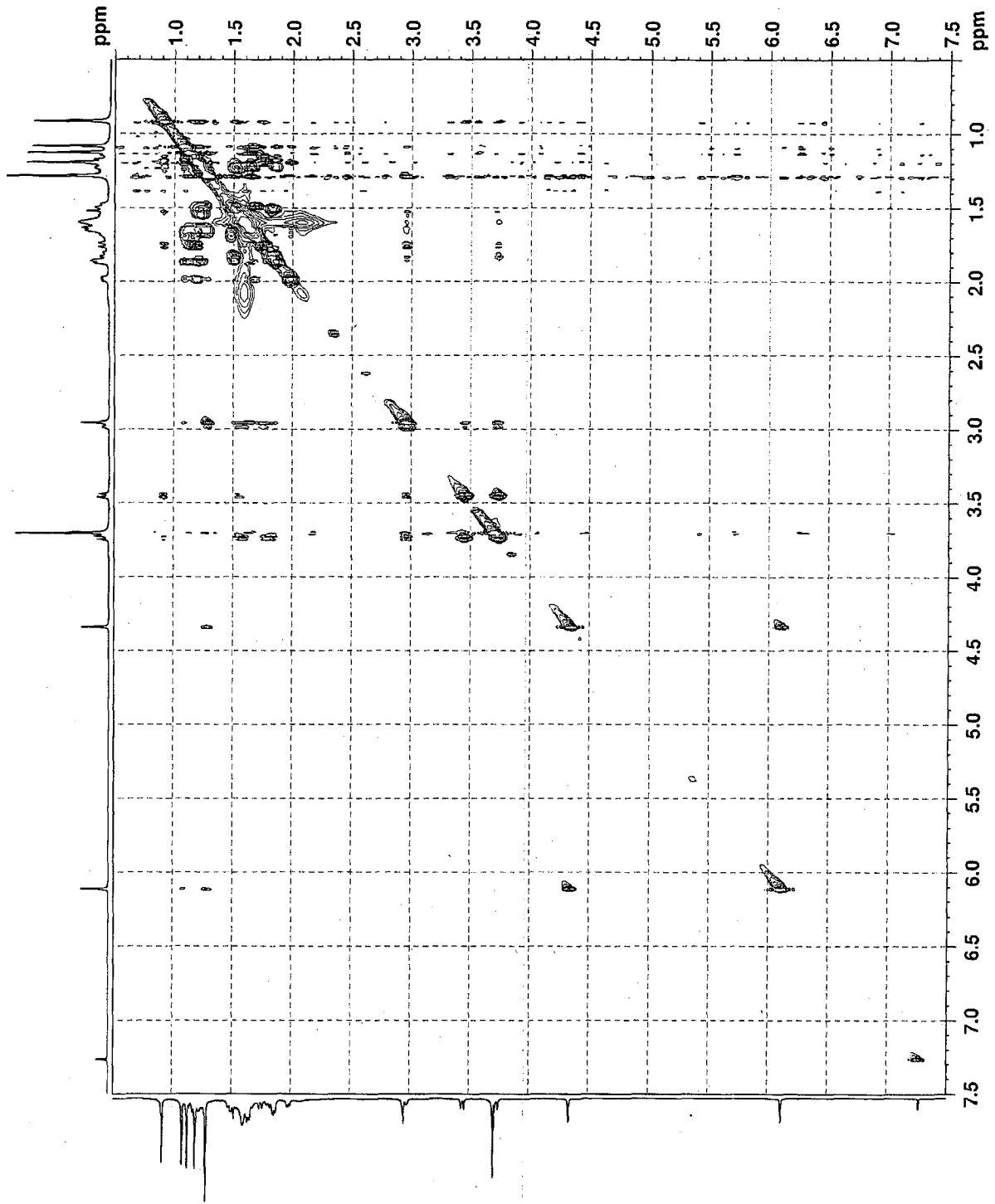
[図1]



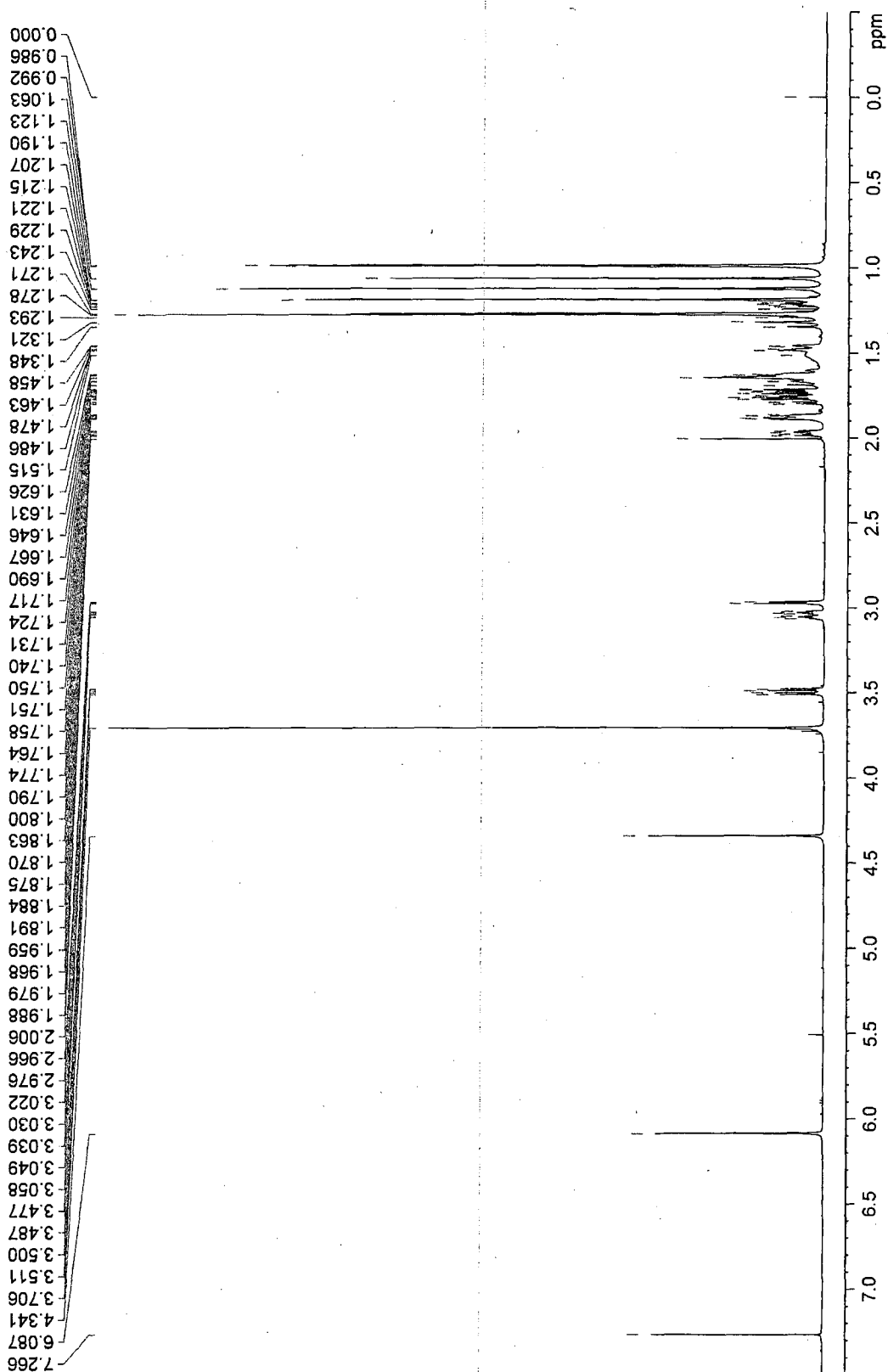
[図2]



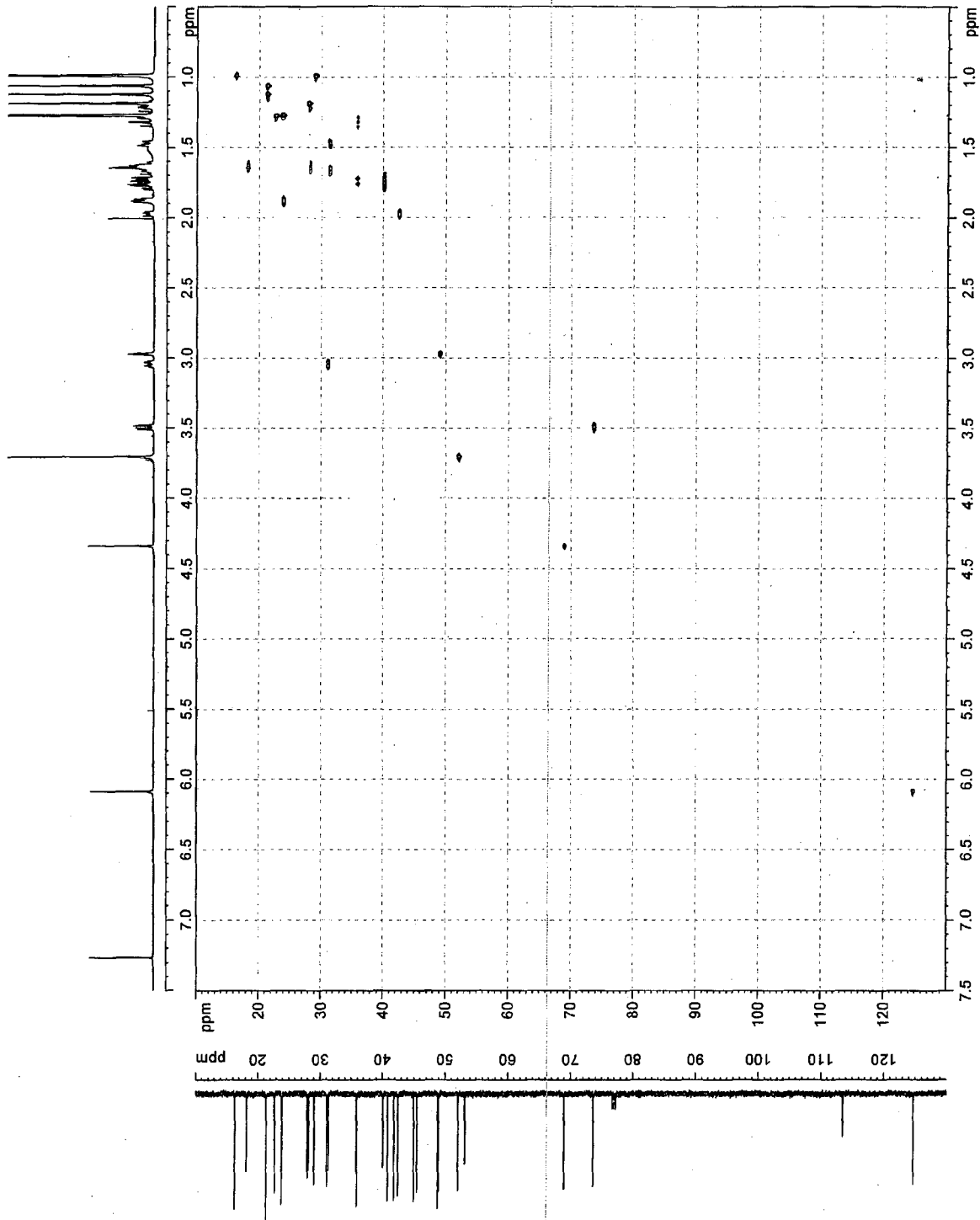
[図3]



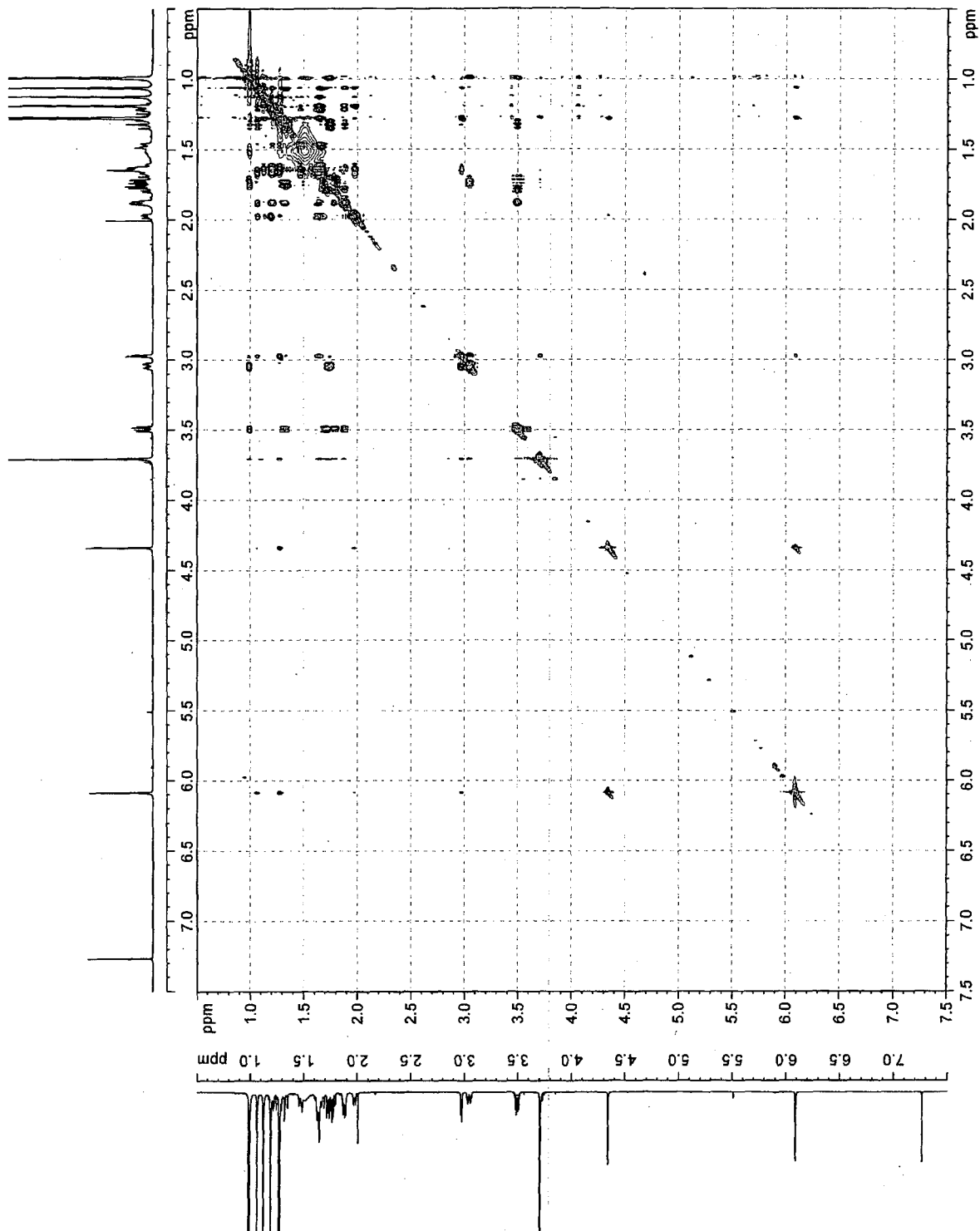
[図4]



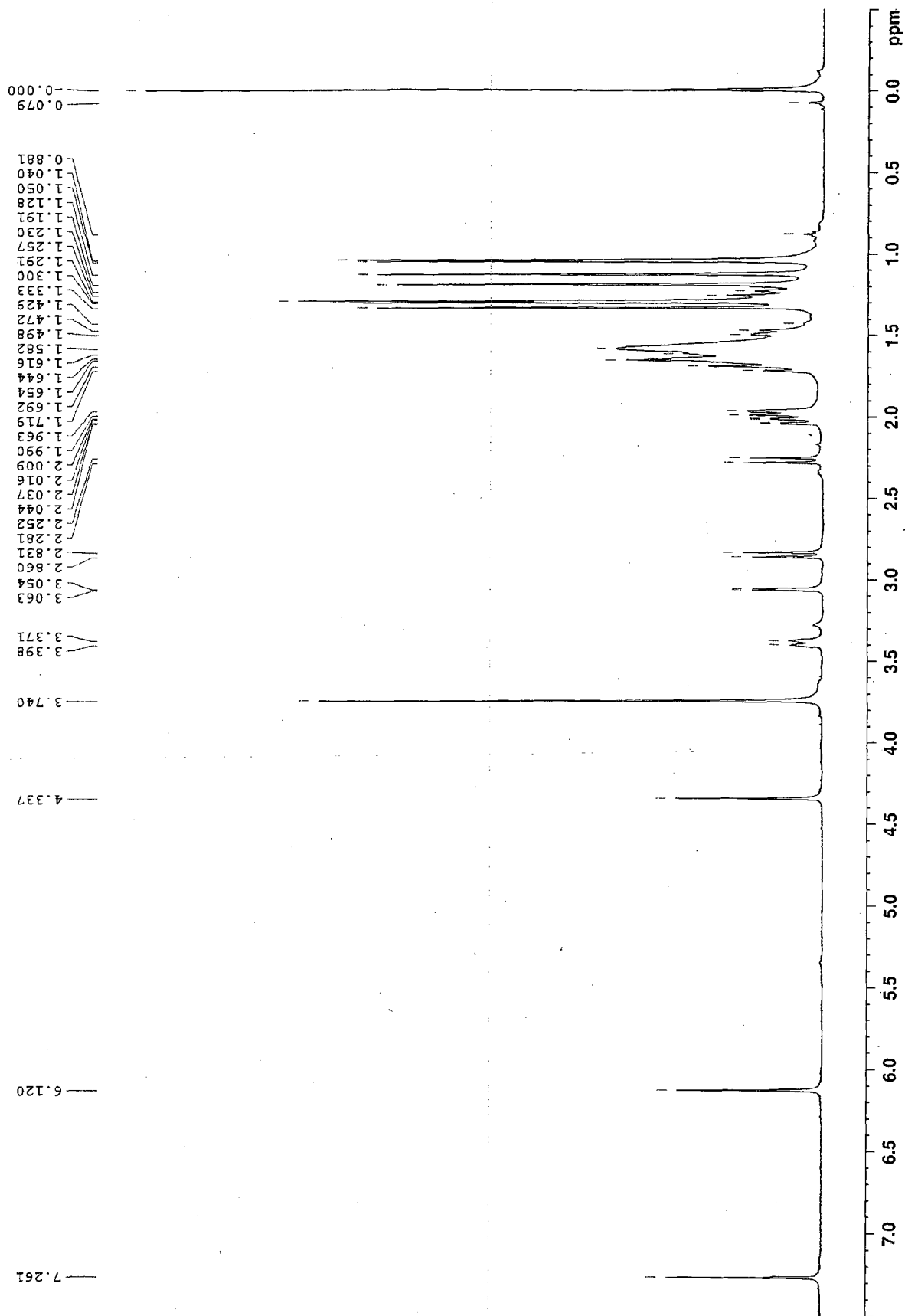
[図5]



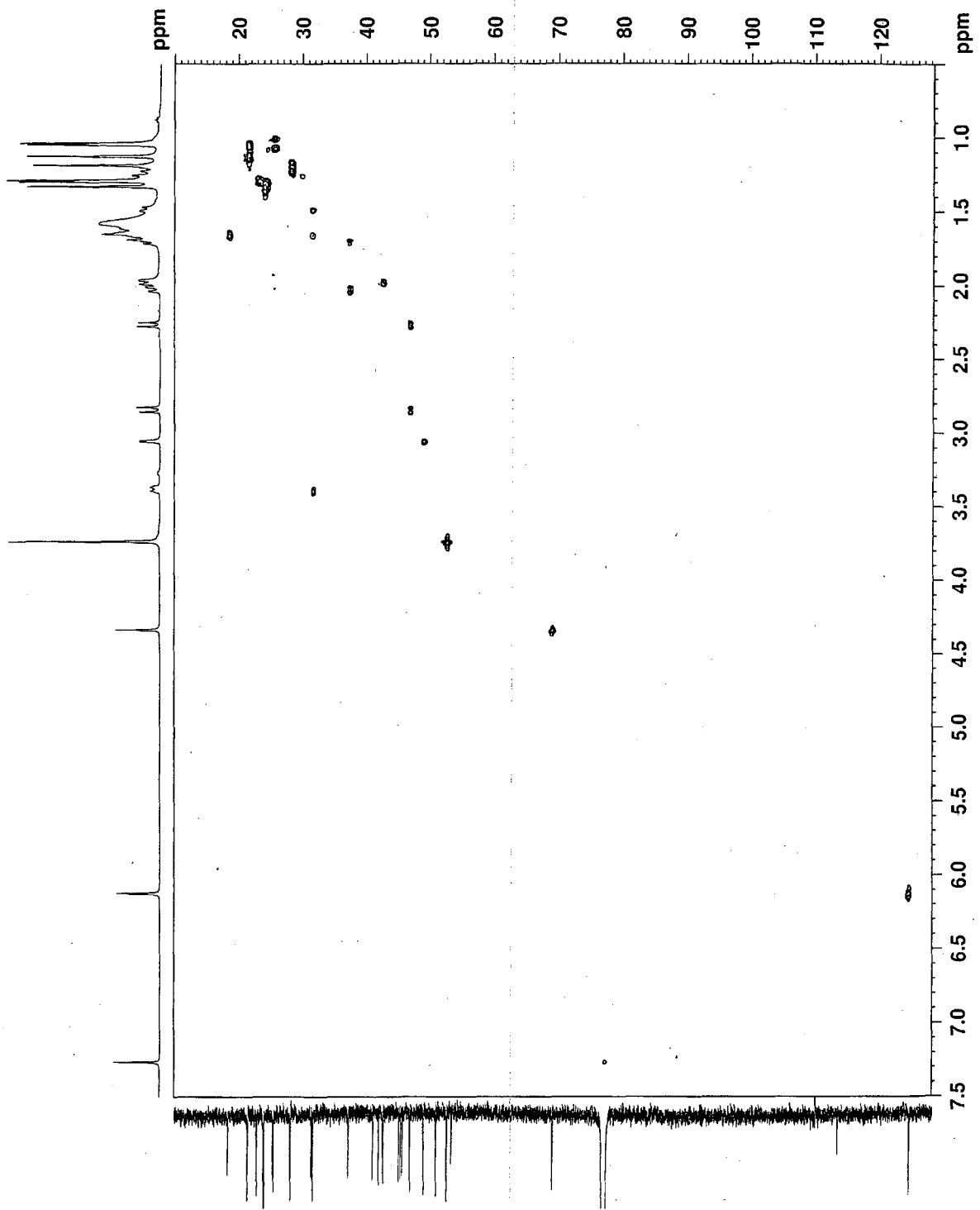
[図6]



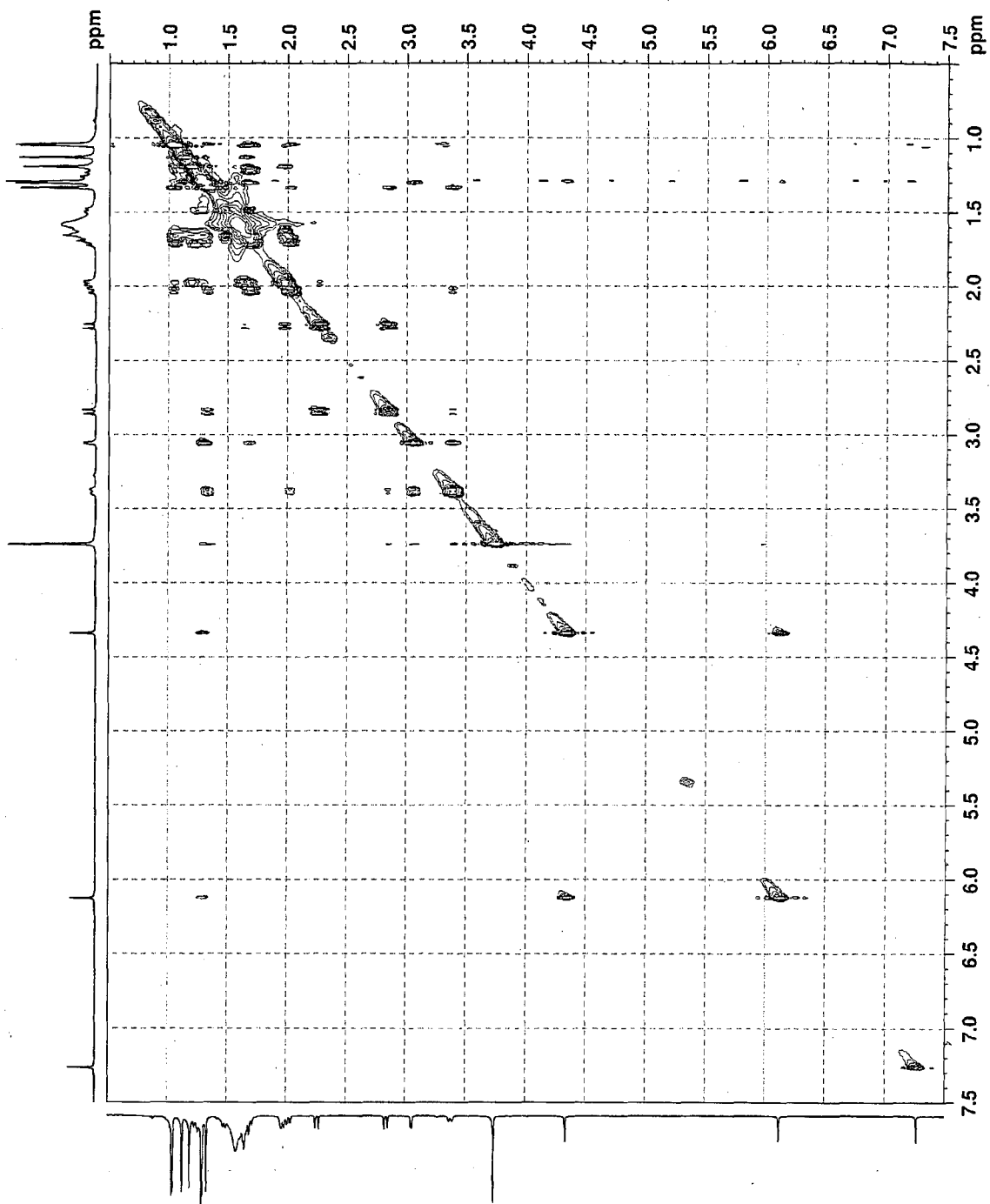
[図7]



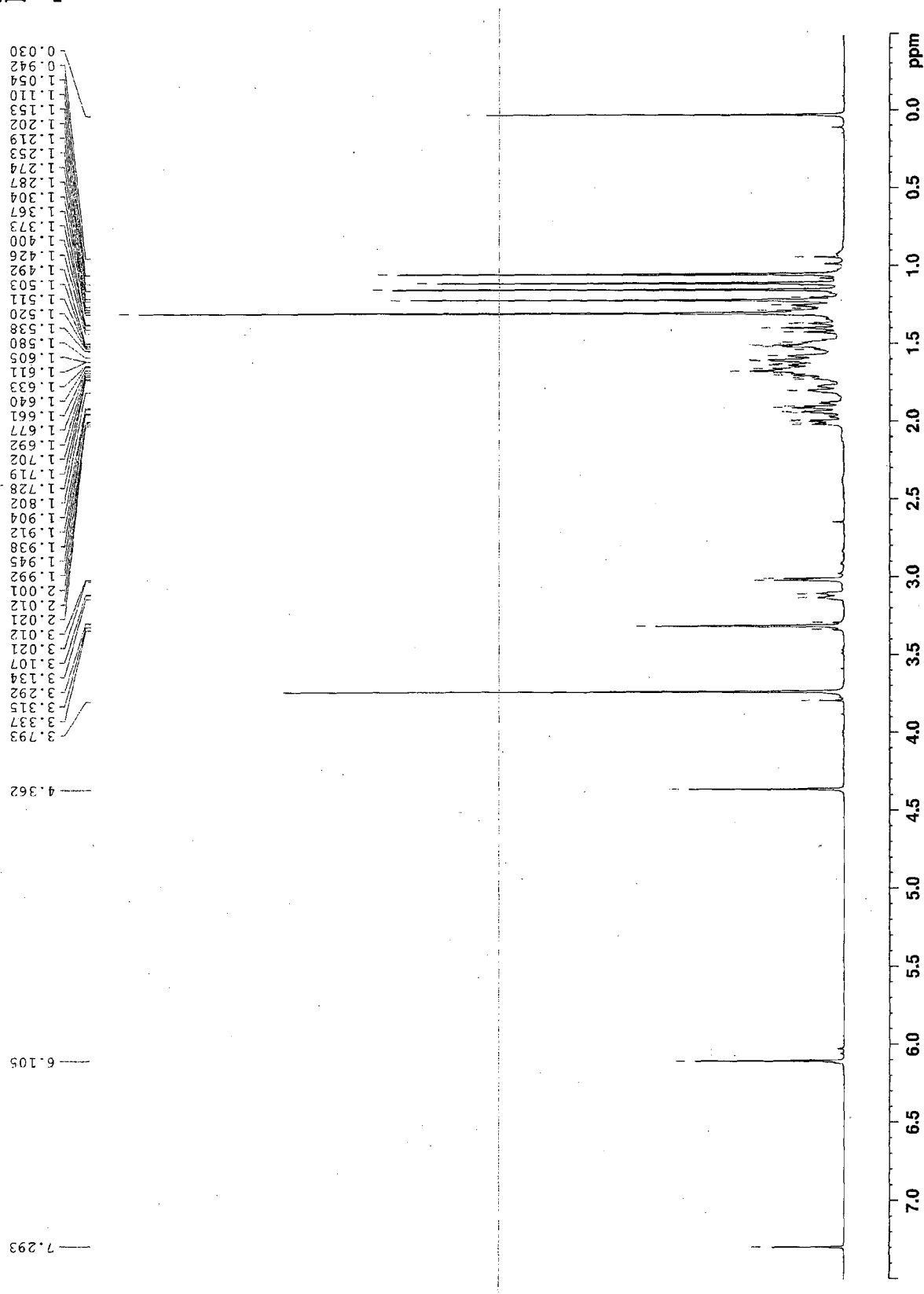
[図8]



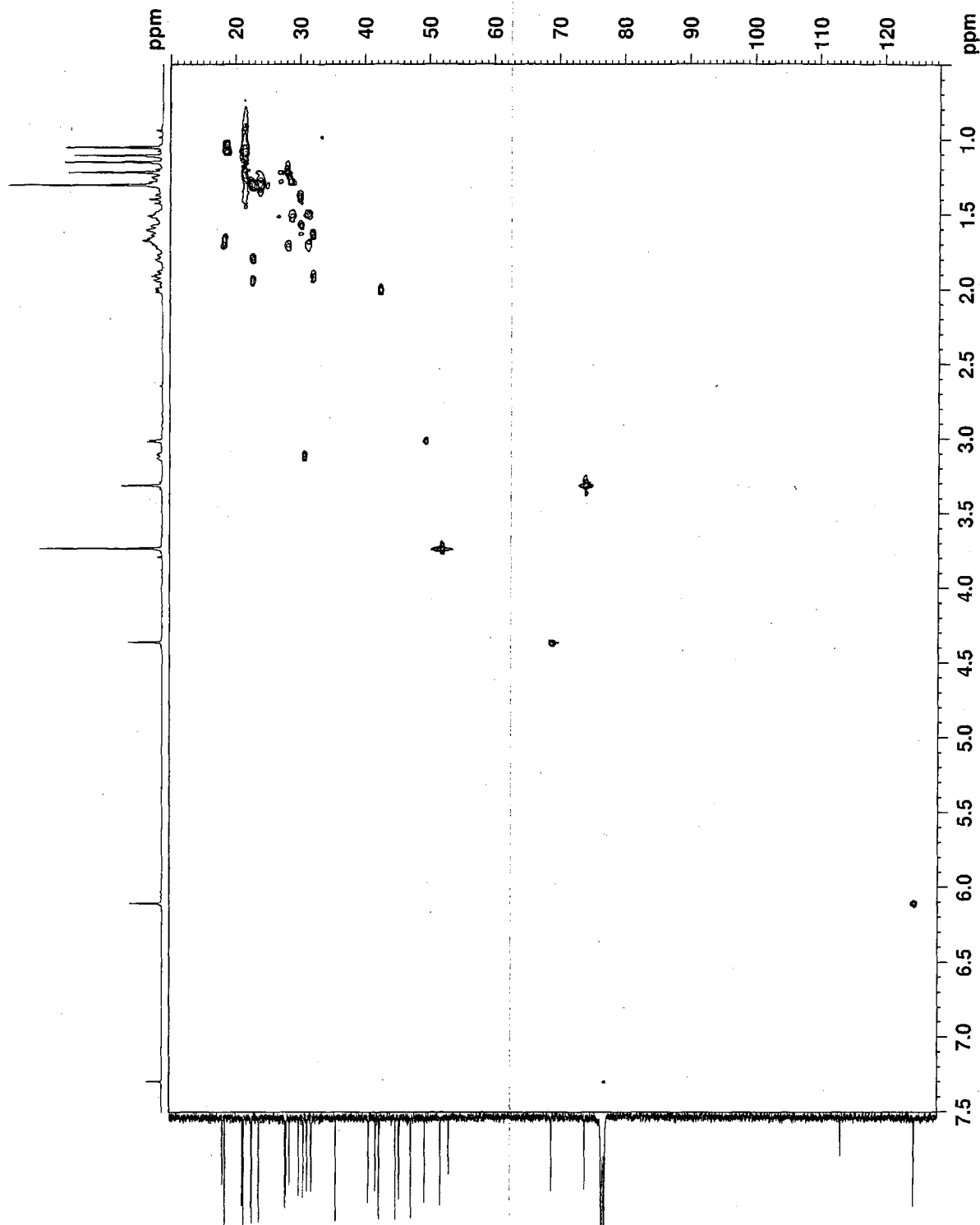
[図9]



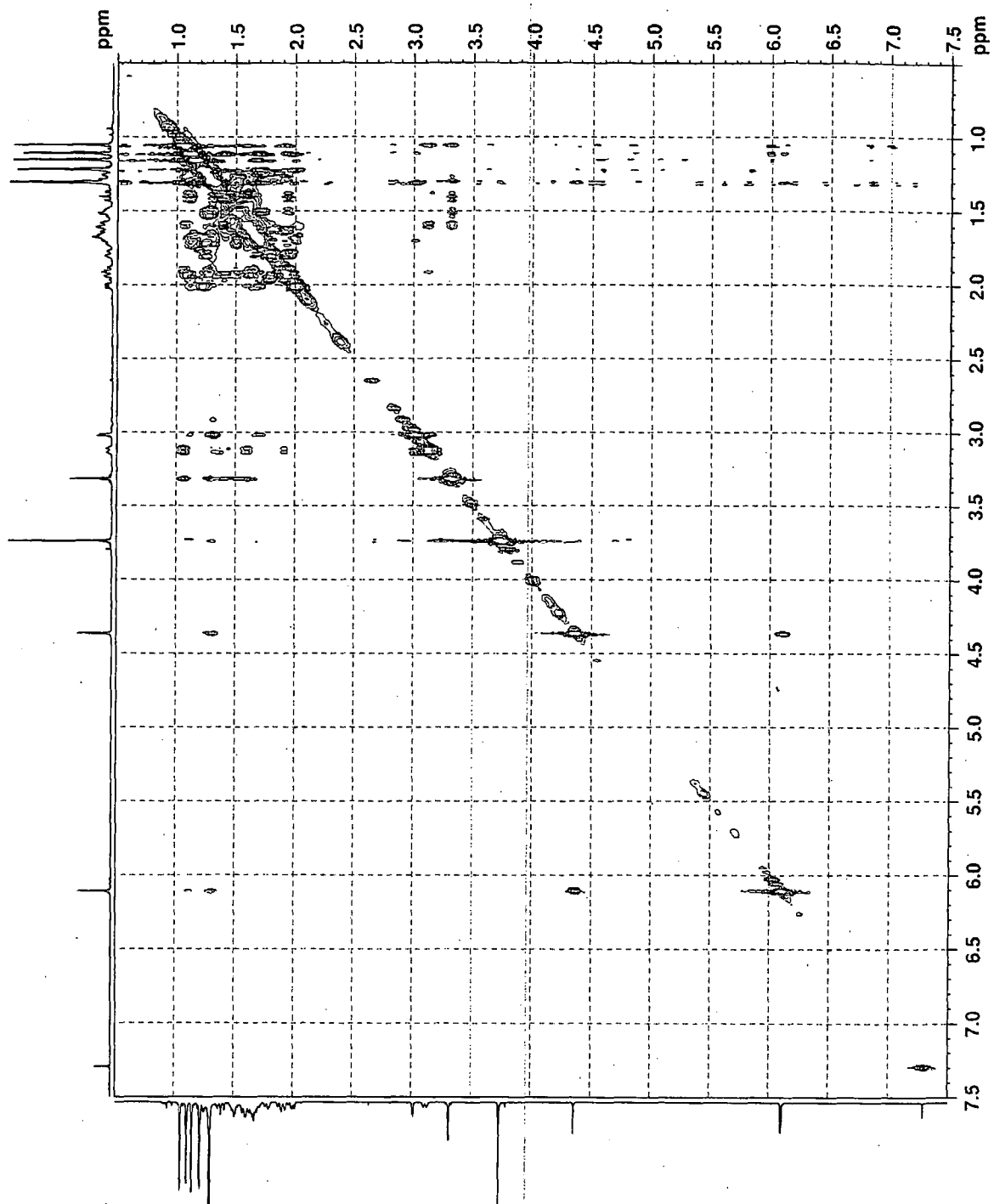
[図10]



[図11]



[図12]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/057222

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
See extra sheet.

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)  
C07J63/00, A61K31/56, A61K31/58, A61P1/16, A61P9/10, A61P11/00,  
A61P11/06, A61P13/02, A61P13/12, A61P21/00, A61P25/14, A61P25/16,  
A61P25/28, A61P27/02, A61P27/06, A61P27/12, A61P27/14, C12N1/14,

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 1996-2014  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), PubMed,  
Science Direct

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2001-525665 A (The Government of the united States of America as Represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services), 11 December 2001 (11.12.2001), claims; pages 25 to 26 & EP 0979312 A & US 2003-0129600 A1	23/1-22, 24-35
X/A	JP 2011-500754 A (Lanxess Deutschland GmbH), 06 January 2011 (06.01.2011), paragraph [0024] & EP 2205087 A & US 2011-0009462 A1	24/1-23, 25-35
X/A	JP 6-247894 A (Sankyo Co., Ltd.), 06 September 1994 (06.09.1994), paragraph [0151] & EP 0605230 A1 & US 5451688 A1	25/1-24, 26-35

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 12 June, 2014 (12.06.14)	Date of mailing of the international search report 24 June, 2014 (24.06.14)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/057222

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HONDA T et al., Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages, Bioorg Med Chem Lett., 1998, Vol.8, p.2711-2714	1-35
A	HONDA T et al., A novel dicyanotriterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-onitrile, active at picomolar concentrations for inhibition of nitric oxide production, Bioorg Med Chem Lett., 2002, Vol.12, p.1027-1030	1-35
P,A	WO 2013/188818 A1 (REATA PHARMACEUTICALS, INC.), 19 December 2013 (19.12.2013), (Family: none)	1-35

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/057222

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

C07J63/00(2006.01)i, A61K31/56(2006.01)i, A61K31/58(2006.01)i,  
A61P1/16(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i,  
A61P11/06(2006.01)i, A61P13/02(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i,  
A61P21/00(2006.01)i, A61P25/14(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i,  
A61P25/28(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P27/06(2006.01)i,  
A61P27/12(2006.01)i, A61P27/14(2006.01)i, C12N1/14(2006.01)i,  
C12P33/00(2006.01)i, C12P33/06(2006.01)i, C12R1/645(2006.01)n,  
C12R1/785(2006.01)n

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

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

C12P33/00, C12P33/06, C12R1/645, C12R1/785

Minimum documentation searched (classification system followed by  
classification symbols)

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))                  Int.Cl. 特別ページ参照</p>											
<p>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. C07J63/00, A61K31/56, A61K31/58, A61P1/16, A61P9/10, A61P11/00, A61P11/06, A61P13/02, A61P13/12, A61P21/00, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28, A61P27/02, A61P27/06, A61P27/12, A61P27/14, C12N1/14, C12P33/00, C12P33/06, C12R1/645, C12R1/785</p>											
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年	
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
<p>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)                  C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N ) , J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I ) , P u b M e d , S c i e n c e D i r e c t</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/A</td> <td>JP 2001-525665 A (ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド ス テイツ オブ アメリカ アズ リプレゼンティッド バイ ザ セクレタリー オブ ザ デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ) 2001.12.11, 特許請求の範囲、25- 26 ページ &amp; EP 0979312 A &amp; US 2003-0129600 A1</td> <td>23/1-22, 24-3 5</td> </tr> <tr> <td>X/A</td> <td>JP 2011-500754 A (ランクセス・ドイチュランド・ゲーエムベーハ ー) 2011.01.06, 【0024】 &amp; EP 2205087 A &amp; US 2011-0009462 A1</td> <td>24/1-23, 25-3 5</td> </tr> </tbody> </table>			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/A	JP 2001-525665 A (ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド ス テイツ オブ アメリカ アズ リプレゼンティッド バイ ザ セクレタリー オブ ザ デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ) 2001.12.11, 特許請求の範囲、25- 26 ページ & EP 0979312 A & US 2003-0129600 A1	23/1-22, 24-3 5	X/A	JP 2011-500754 A (ランクセス・ドイチュランド・ゲーエムベーハ ー) 2011.01.06, 【0024】 & EP 2205087 A & US 2011-0009462 A1	24/1-23, 25-3 5
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/A	JP 2001-525665 A (ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド ス テイツ オブ アメリカ アズ リプレゼンティッド バイ ザ セクレタリー オブ ザ デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ) 2001.12.11, 特許請求の範囲、25- 26 ページ & EP 0979312 A & US 2003-0129600 A1	23/1-22, 24-3 5									
X/A	JP 2011-500754 A (ランクセス・ドイチュランド・ゲーエムベーハ ー) 2011.01.06, 【0024】 & EP 2205087 A & US 2011-0009462 A1	24/1-23, 25-3 5									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 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                  「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日                  1 2 . 0 6 . 2 0 1 4</p>	<p>国際調査報告の発送日                  2 4 . 0 6 . 2 0 1 4</p>										
<p>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</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)                  北田 祐介                  電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<p>4 N 4 8 6 8</p>									

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 請求項の番号
X/A	JP 6-247894 A (三共株式会社) 1994. 09. 06, 【0151】 & EP 0605230 A1 & US 5451688 A1	25/1-24, 26-3 5
A	HONDA T et al., Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages, Bioorg Med Chem Lett., 1998, Vol.8, p.2711-2714	1-35
A	HONDA T et al., A novel dicyanotriterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-onitrile, active at picomolar concentrations for inhibition of nitric oxide production, Bioorg Med Chem Lett., 2002, Vol.12, p.1027-1030	1-35
PA	WO 2013/188818 A1 (REATA PHARMACEUTICALS, INC.) 2013. 12. 19, (フ ァミリーなし)	1-35

## 発明の属する分野の分類

C07J63/00(2006.01)i, A61K31/56(2006.01)i, A61K31/58(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i, A61P13/02(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P25/14(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P27/06(2006.01)i, A61P27/12(2006.01)i, A61P27/14(2006.01)i, C12N1/14(2006.01)i, C12P33/00(2006.01)i, C12P33/06(2006.01)i, C12R1/645(2006.01)n, C12R1/785(2006.01)n