

(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
2010 年 8 月 26 日(26.08.2010)

(10) 国際公開番号
WO 2010/095741 A1

- (51) 国際特許分類:
C07J 17/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/052656
- (22) 国際出願日: 2010 年 2 月 22 日(22.02.2010)
- (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 2009-039770 2009 年 2 月 23 日(23.02.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 Aichi (JP). 学校法人名城大学(MEIJO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4688502 愛知県名古屋市天白区塩釜口 1 丁目 5 0 1 番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 小鹿 一 (OJIKAWA, Makoto) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋

市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 間宮 隆吉(MAMIYA, Takayoshi) [JP/JP]; 〒4688503 愛知県名古屋市天白区八事山 1 5 0 学校法人名城大学八事キャンパス内 Aichi (JP). 鍋島 俊隆(NABESHIMA, Toshitaka) [JP/JP]; 〒4688503 愛知県名古屋市天白区八事山 1 5 0 学校法人名城大学八事キャンパス内 Aichi (JP).

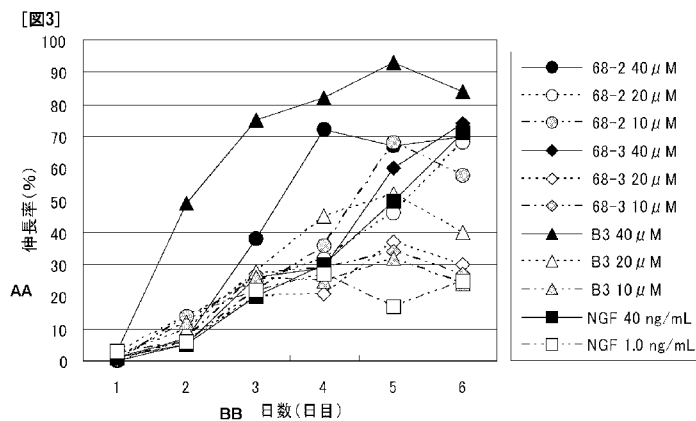
(74) 代理人: 大川 宏(OHKAWA, Hiroshi); 〒4500002 愛知県名古屋市中村区名駅 3 丁目 2 番 5 号 Aichi (JP).

(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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

[続葉有]

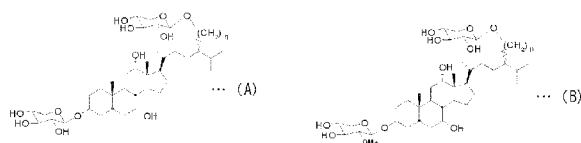
(54) Title: NOVEL STEROID DERIVATIVE AND PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF, AND PHARMACEUTICAL PREPARATION COMPRISING THE NOVEL STEROID DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 新規ステロイド誘導体及びその製造方法、並びにその新規ステロイド誘導体を含有する医薬



(57) Abstract: Disclosed is a novel steroid derivative which is expected to exhibit an NGF activity. Specifically disclosed is a compound represented by formula (A) or (B). (In the formulae (A) and (B), n represents 1 or 2.)

(57) 要約: 【課題】 NGF 活性の発現が期待できる新規ステロイド誘導体を提供すること。 【解決手段】 下記式 (A) 又は (B) で示される化合物。 (式 (A)、(B) 中の n は 1 又は 2)



AA RATE OF EXTENSION (%)
BB DAYS (day)



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

新規ステロイド誘導体及びその製造方法、並びにその新規ステロイド誘導体を含む医薬

技術分野

[0001] 本発明は、NGF活性の発現が期待できる新規ステロイド誘導体及びその製造方法、並びにその新規ステロイド誘導体を含む医薬に関する。

背景技術

[0002] 本発明者らはオニヒトデから高いNGF様活性を示すステロイド誘導体を発見している（特許文献1：WO2006/090910号公報）。なお、NGFに対してその作用を増強する作用を有する場合があります、以下「NGF増強活性」と称する。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] しかしながら、特許文献1に開示したステロイド誘導体は高い活性を示すものの天然物由来の化合物であるため、将来にわたる十分な供給量の確保が困難である。従って、工業生産可能な方法にて製造可能な新規ステロイド誘導体が求められる。

[0004] 本発明は上記実情に鑑み完成したものであり、新規ステロイド誘導体及びその製造方法を提供することを解決すべき課題とする。

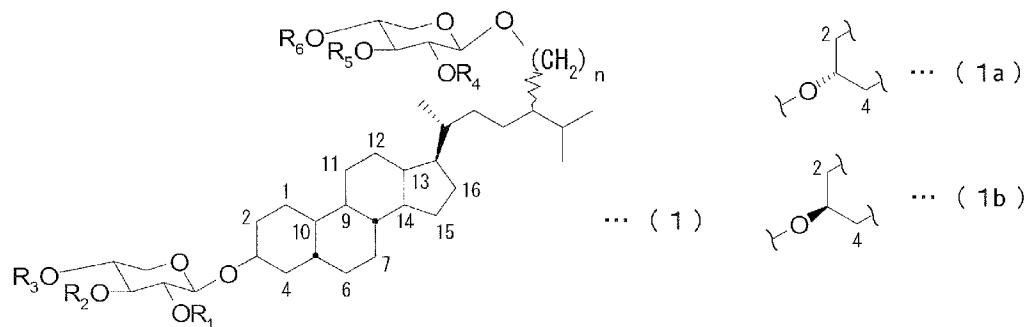
[0005] また、本発明で提供する新規ステロイド誘導体を含む医薬を提供することも解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 上記課題を解決する請求項1に係る本発明の新規ステロイド誘導体の特徴は、下記一般式（1）で示される化合物であることにある。

[0007]

[化1]



[0008] (式(1)中、 $R_1 \sim R_6$ は水素又はアルキル基から全て独立して選択可能な官能基であり、同一であっても異なるものであっても良い。 n は1又は2である。ステロイド骨格中の1、2、4～16位の炭素原子に結合する水素元素のうちの1つ以上をメチル基、OH基、又はメトキシ基に置換できる。)

[0009] なお、式(1)のステロイド誘導体は式(1a)及び式(1b)の少なくとも一方である。

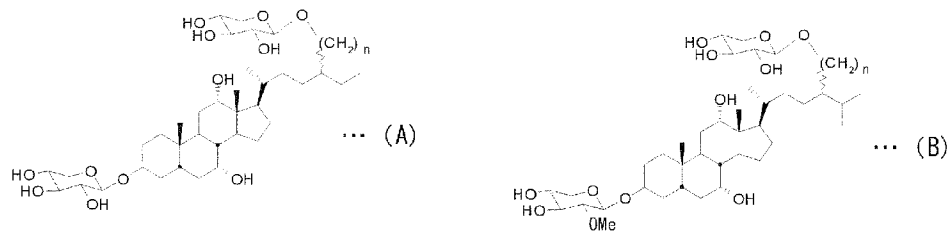
[0010] 式(1a)及び式(1b)で表されるステロイド誘導体は式(1)のステロイド誘導体におけるステロイド骨格の3位における立体異性体である。つまり、式(1)のステロイド誘導体はステロイド骨格における3位の立体構造が限定されていない化合物である。ここで、式(1a)及び式(1b)のステロイド誘導体はステロイド骨格の3位の立体構造が特定されている以外の構造は式(1)のステロイド誘導体と同じであるため、ステロイド骨格の3位の近傍以外の部分の化学構造を省略して記載している。

[0011] 以下に示す式(2)～(4)、式(A)、及び(B)においても式(1)と同様にそれぞれの化合物がもつステロイド骨格における3位の立体構造は式(1a)及び式(1b)のいずれかに相当する立体構造をもつ化合物からなり、ステロイド骨格の3位の立体構造が式(1a)に相当する化合物である式(2a)～(4a)、式(Aa)、及び(Ba)と、3位の立体構造が式(1b)に相当する化合物である式(2b)～(4b)、式(Ab)、及び(Bb)とからなる(全て図示略)。

[0012] 上記課題を解決する請求項2に係る本発明の新規ステロイド誘導体の特徴

は、請求項 1 において、前記一般式（１）に記載の化合物は、下記式（Ａ）又は（Ｂ）であることにある。

[0013] [化2]



[0014] （式（Ａ）、（Ｂ）中の n は 1 又は 2）

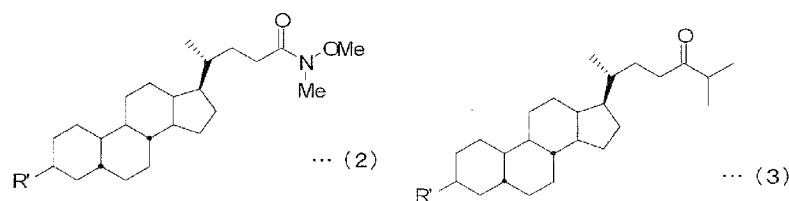
上記課題を解決する請求項 3 に係る本発明の新規ステロイド誘導体の製造方法の特徴は、上記一般式（１）で示される新規ステロイド誘導体を製造する方法であって、

下記一般式（２）で示される第 1 中間体に対し、 Me_2CHMgX （ X は Cl 又は Br ）で表される第 1 反応試薬を反応させ、一般式（３）で表される第 2 中間体を得る工程と、

前記第 2 中間体から最終生成物とする工程と、

を有することにある。従って、一般式（１）で示される新規ステロイド誘導体に含まれる上記式（Ａ）、式（Ｂ）で示される新規ステロイド誘導体を製造することも可能である。

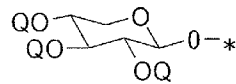
[0015] [化3]



[0016] （式（２）及び（３）で示された化合物がもつステロイド骨格中、前記一般式（１）と対応する位置に同じ置換基をもつ。但し、 OH 基をもつ場合には OQ 基が代わりに導入される。； R' は OQ 基、 OH 、又は、

[0017]

[化4]



(* の部分でステロイド骨格の炭素原子に結合)

[0018] である。 ; Qは水酸基の保護基であり、全て同一であるか、又は、異なるものがある基である。)

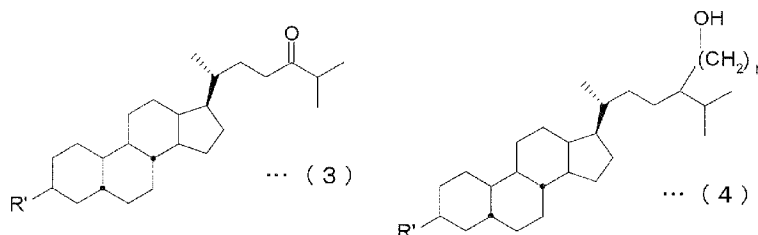
[0019] 上記課題を解決する請求項 4 に係る本発明の新規ステロイド誘導体の製造方法の特徴は、上記一般式 (1) で示される新規ステロイド誘導体を製造する方法であって、

下記一般式 (3) で示される第 2 中間体に対し、下記一般式 (5) ~ (8) で表される化合物のうちの 1 つである第 2 反応試薬を反応させ、一般式 (4) で表される第 3 中間体を得る工程と、

前記第 3 中間体から最終生成物とする工程と、

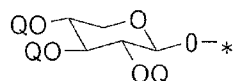
を有することにある。従って、一般式 (1) で示される新規ステロイド誘導体に含まれる上記式 (A) 、式 (B) で示される新規ステロイド誘導体を製造することも可能である。

[0020] [化5]



[0021] (式 (3) 及び (4) で示された化合物がもつステロイド骨格中、前記一般式 (1) と対応する位置に同じ置換基をもつ。但し、OH基をもつ場合には OQ基が代わりに導入される。 ; R' は OQ基、OH、又は、

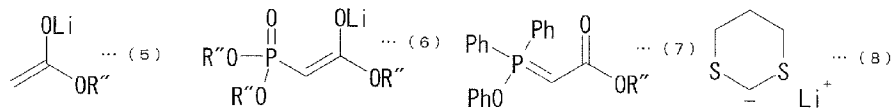
[0022] [化6]



(* の部分でステロイド骨格の炭素原子に結合)

[0023] である。；式（３）及び（４）中、Ｑは水酸基の保護基であり、全て同一であるか、又は、異なるものがある基である。；前記第２反応試薬として、式（５）～（７）のうちの何れかを選択する場合には、 n が２、式（８）の化合物を選択する場合には n が１である。）

[0024] [化7]



[0025] （式（５）～（７）中、 R'' はアルキル基から独立して選択可能である。）

上記課題を解決する請求項５に係る本発明の医薬の特徴は、請求項１に記載の新規ステロイド誘導体、医薬上許容できるそのエステル又はそのプロドラッグを含有することにある。

[0026] 上記課題を解決する請求項６に係る本発明の医薬の特徴は、請求項５において、 NGF 関連活性を発現することにより作用することにある。ここで、 NGF 関連活性をもつ医薬は「産業上の利用可能性」欄で説明した通り、薬理作用として痴呆治療、学習能力向上などに有効な作用を発揮することが期待される。

発明の効果

[0027] 請求項１に係る発明によれば、 NGF 関連活性の発現が期待でき、簡易な方法にて製造可能なステロイド誘導体を提供できる。特に請求項２に係る発明のステロイド誘導体が優れている。

[0028] 請求項３及び４に係る発明によれば、簡易な方法にて本発明の新規ステロイド誘導体を製造することができる。

[0029] 請求項５及び６に係る発明によれば、本発明の新規ステロイド誘導体をもつ NGF 関連活性などの薬理作用を発現できる医薬を提供できる。

図面の簡単な説明

[0030] [図1] 実施例における新規ステロイド誘導体の合成方法（その１）を示す図である。

[図2]実施例におけるNGF様活性の測定結果を示すグラフである。

[図3]実施例におけるNGF増強活性の測定結果を示すグラフである。

[図4]実施例における新規ステロイド誘導体の合成方法（その2）を示す図である。

[図5]実施例におけるY字型迷路実験の結果（MO-I V-52-1）を示すグラフである。

[図6]実施例におけるY字型迷路実験の結果（B3）を示すグラフである。

[図7]実施例における新奇物体認知試験の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0031] （新規ステロイド誘導体）

本発明の新規ステロイド誘導体は、上述した一般式（1）にて表される化合物である。この化合物は後述する本発明の製造方法により簡易に製造可能な構造である。

[0032] ここで、 $R_1 \sim R_6$ のうち、 R_1 についてはメチル基であることがNGF関連活性増強効果の観点からは望ましい（特許文献1参照）。また、ステロイド骨格中に導入されることが望ましい置換基及びその位置としては、10位と13位とにメチル基、6位と8位と15位と16位にOH基がそれぞれ導入されることが望ましい。また、10位と13位とにメチル基、7位と12位とにOH基がそれぞれ導入されることが望ましい（例えば式（A）の化合物： $n=2$ ）。式（A）の化合物における R_1 に相当するOH基をOMe基にすることが望ましい（式（B））。 n は1とすることが天然物に近いため望ましい。

[0033] （新規ステロイド誘導体の製造方法）

本発明の新規ステロイド誘導体の製造方法は、(i)上記一般式（2）で表される第1中間体から上記一般式（3）で表される第2中間体を得る工程（以下、第1工程と称する）、及び／又は、(ii)上記一般式（3）で表される第2中間体から上記一般式（4）で表される第3中間体を得る工程（以下、第2工程と称する）を有し、得られた中間体から一般式（1）で表される最終

生物を得る工程を更に有する。式（２）～（４）中の R' が OQ 又は OH 基である場合には最終的に糖が結合される。

[0034] ・第１工程

第１工程は第１中間体における $-NMe$ (OMe) 基に変えて、イソプロピル基を導入する工程である。この反応はエーテル溶媒などを用いて行うことができる。 Me_2CHMgX における X としては Cl が望ましい。

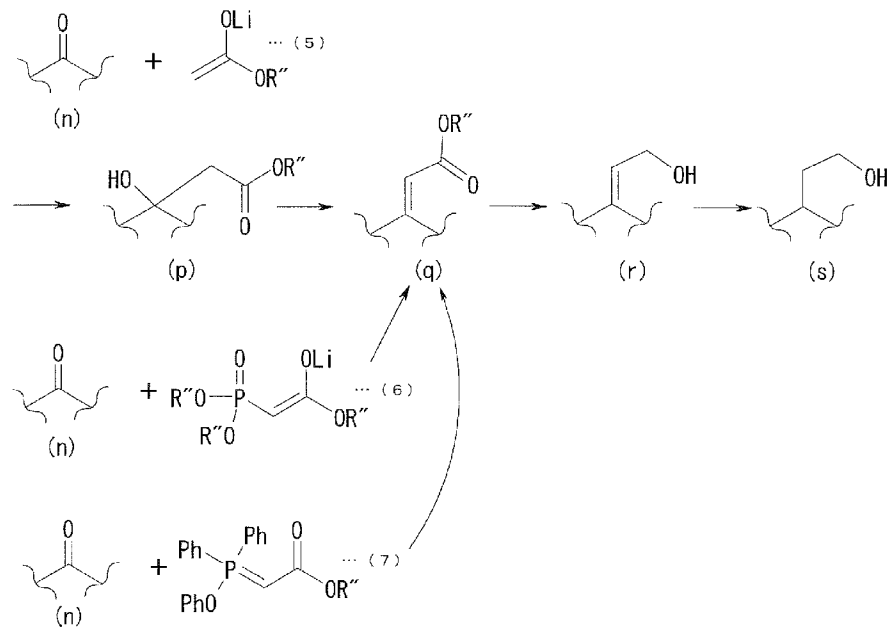
[0035] ・第２工程

第２工程は第２中間体におけるケトンに第２反応試薬を付加反応させて、更に炭素－炭素結合を伸長した第３中間体を形成する工程である。第２反応試薬として式（５）～（７）の化合物を用いた場合には一般式（１）中の n が２であるステロイド誘導体となり、式（８）の化合物を用いた場合には n が１であるステロイド誘導体となる。

[0036] ここで第２工程において進行する反応について下式に基づき簡単に説明する。第２中間体がもつケトンの部分（ n ）に式（５）の第２反応試薬が反応すると、 Li が脱離した第２反応試薬がケトンの炭素原子に付加して構造（ p ）を形成する。その後、塩化チオニル（ $SOCl_2$ ）などを用いて脱水し、構造（ q ）を形成する。次いで構造（ r ）、構造（ s ）と順次反応を進める。構造（ s ）が第３中間体がもつ部分構造である。式（６）、（７）で表される第２反応試薬を用いると第２中間体の部分構造（ n ）から第３中間体の部分構造（ q ）に１段階の反応で変化させることができる。この工程により一般式（１）における n が２のステロイド誘導体を製造できる。

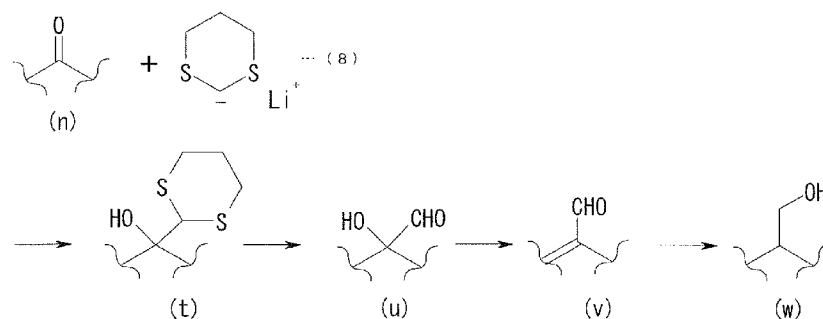
[0037]

[化8]



[0038] 第2中間体がもつケトンの部分 (n) に式 (8) の第2反応試薬が反応すると、Liが脱離した第2反応試薬がケトンの炭素原子に付加して構造 (t) を形成する。その後、塩化水銀(II)などで構造 (u) を形成する。その後、脱水して構造 (v)、水素付加と還元と (順不同) により構造 (w) と順次反応を進める。構造 (w) が第3中間体がもつ部分構造である。

[0039] [化9]



[0040] (医薬)

本発明の医薬は本発明の新規ステロイド誘導体、医薬上許容できるエステル、又はプロドラッグを有効成分として含有する。ここで本発明の医薬は、生体内に投与された後、生体内において本発明のステロイド誘導体の形態で存在するか、又は、本発明のステロイド誘導体の形態を一瞬でも経るもので

ある。本発明の医薬は特にNGF関連活性の発現が期待される。NGF関連活性の発現により、脳内などにおける神経への作用が発現して、薬理作用として痴呆治療、学習能力向上などに有効な作用を発揮することが期待される。後述するマウスを用いた実施例にて説明するように、加齢に伴う短期記憶障害及び認知記憶障害を改善することが推認された。

[0041] 医薬上許容できるエステル化について説明する。本発明の新規ステロイド誘導体はOH基を有することがあり、その場合はそのOH基が医薬上許容できる基にてエステル化されていても良い。エステル化する基としては限定はされないがカルボン酸、リン酸、ホスフィン酸、スルホン酸、スルフィン酸、及びボロン酸を含む酸性基が例示できる。

[0042] 次に医薬上許容できるプロドラッグについて説明する。本願において本発明の新規ステロイド誘導体のプロドラッグとは、インビボで投与すると、その化合物が生物学的、薬学的、又は治療的に活性のある形態（活性化合物：本願では本発明の新規ステロイド誘導体のうちの1つの形態）に、1つ以上のステップ又は過程によって代謝されるか、或いは別途に変換される化合物である。つまり、プロドラッグは、生体内において代謝過程などにより活性化合物を再生する化合物である。従って、前述したエステル化した化合物がプロドラッグに該当することも考えられる。プロドラッグは、薬物の代謝安定性又は輸送特性を変更するように、副作用又は毒性を遮蔽するように、薬物の風味を改善するように、又は薬物のその他の性質又は特性を変えるように設計することができる。インビボでの薬力学的過程及び薬物代謝の知識によって、当業者は、薬学的に活性のある化合物を見出したら、その化合物のプロドラッグを設計することができる（例えば、Nogradyの著作、(2005) *Medical Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York を参照）。本発明の医薬の製剤化は常法に従って行うことができる。製剤化する場合には、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水、溶媒など）を含有させることができる。賦形剤としては乳糖、デンプン

、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。溶媒としては水その他、DMF、アルコールなどを単独又は混合溶媒として用いることができる。

[0043] 製剤化する場合の剤形も特に限定されない。剤形の例は錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、外用剤、及び座剤である。

実施例

[0044] (ステロイド誘導体の合成：その1)

図1に示す経路にて化合物(Aa)に相当する、SK-IV-68-2及びSK-IV-68-3を合成した。SK-IV-68-2及びSK-IV-68-3は図1に示すように、24位の炭素原子における立体異性体であるが、その立体構造(R配置、S配置)は特定できていない。

[0045] コール酸ナトリウム1.3gをDMF(10mL)に溶解し、ヨウ化メチル0.37mLを加え、室温で15時間攪拌することにより、コール酸メチル1.2gを得た(収率97%)。

[0046] コール酸メチル316mgを無水ジクロロメタン4.5mLに溶解し、2,6-ルチジン2.1mLとt-ブチルジメチルシリルトリフラート2.1m

Lを加えて、室温で15時間攪拌することにより化合物(10) 521mgを得た(収率97%)。

[0047] 化合物(10) 23mgをテトラヒドロフラン1mLに溶解し、46%フッ化水素酸0.11mLを加えて、室温で1時間攪拌することにより化合物(11) 19mgを得た(収率95%)。

[0048] 化合物(11) 102mg、シアン化水銀52mg、臭化水銀75mgを無水アセトニトリル3mLに溶解し、2, 3, 4-トリ-*O*-ピバロイル- α -*D*-ブロモキシロース64mgを加えて、室温で3時間攪拌することにより化合物(12)を得た(収率49%)。

[0049] 化合物(12) 924mgをメタノール34mLに溶解し、炭酸カリウム1.27gを加え、室温で2時間攪拌することによりトリオール735mgを得た(収率92%)。このトリオール728mgを無水ジクロロメタン10mLに溶解し、2, 6-ルチジン1.3mLと*t*-ブチルジメチルシリルトリフラート1.3mLを加えて、室温で11時間攪拌することにより化合物(13) 984mgを得た(収率94%)。

[0050] 化合物(13) 190mgをメタノール(5.6mL)とテトラヒドロフラン(3.4mL)の混合溶媒に溶解し、水酸化リチウム一水和物433mgを水3.0mLに溶解した溶液を滴下した。この混合物を50°Cで1.5時間攪拌した後、1N塩酸120mLで処理することによりカルボン酸189mgを得た(収率99%)。このカルボン酸179mgを無水ジクロロメタン4.0mLに溶解し、1, 1-カルボニルジイミダゾール53mgを加えて室温で1時間攪拌した。この混合物に*N*, *O*-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩77mgを加え、室温で1.5時間攪拌することにより化合物(14) 177mgを得た(収率95%)。

[0051] 化合物(14) 778mgを無水テトラヒドロフラン24mLに溶解し、0°Cで塩化イソプロピルマグネシウム(Me_2CHMgX におけるXがC1の化合物)のテトラヒドロフラン溶液(2M) 4.9mLを滴下し、0°Cで30分、50°Cで11時間攪拌することにより化合物(15) 327mgを得

た（収率43％）。

[0052] 無水テトラヒドロフラン6.1 mLにリチウムヘキサミチルジシラジドのテトラヒドロフラン溶液（1.0 M）1.7 mLを加え、 -78°C に冷却し、無水酢酸エチル0.18 mLを滴下して15分攪拌した。この混合物に化合物（15）317 mgのテトラヒドロフラン溶液（10 mL）を滴下し、 -78°C で1時間攪拌することにより化合物（16）290 mgを得た（収率85％）。

[0053] 無水ピリジン2.3 mLに塩化チオニル0.27 mLを加え室温で40分攪拌した後、 0°C に冷却した。ここに化合物（16）526 mgの無水ジクロロメタン溶液（5.6 mL）を滴下し、 0°C で1.5時間攪拌することにより、脱水化合物の粗生成物518 mgを得た。次いで、無水テトラヒドロフラン3.5 mLに水素化アルミニウムリチウムのテトラヒドロフラン溶液（2.0 M）1.1 mLを加え、 0°C に冷却後、前述の脱水化合物518 mgのテトラヒドロフラン溶液（8.3 mL）を滴下した。この混合物を室温で1.5時間攪拌することによりアルコール457 mgを得た（収率92％）。次いで、このアルコール47.1 mgを酢酸エチル1.5 mLに溶解し、白金黒23.6 mgを加え、水素雰囲気下、室温で26時間攪拌することにより化合物（17）41.7 mgを得た（収率88％）。

[0054] 化合物（17）62.5 mg、シアン化水銀20 mg、臭化水銀29 mgを無水ジクロロメタン1.8 mLに溶解し、アセトブロモキシロース36.7 mgを加えて、室温で2.5時間攪拌することにより化合物（18）31.4 mgを得た（収率38％）。

[0055] 化合物（18）7.4 mgを無水トルエン0.1 mLに溶解し、 0°C に冷却し、水素化ジイソブチルアルミニウムのトルエン溶液（1.5 M）0.013 mLを加え、 0°C で30分攪拌することにより化合物（19）3.3 mgを得た（収率53％）。

[0056] 化合物（19）4.4 mgをテトラヒドロフラン0.16 mLに溶解し、フッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液（1 M）0.1

4 mLを加え、55℃で14時間攪拌した。得られた生成物をテトラヒドロフラン0.06 mLに溶解し、フッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液(1M)0.18 mLを加え、100℃で20時間、120℃で7時間、130℃で19時間攪拌することにより化合物(A) (nは2) 0.8 mgを得た(収率32%)。この物質は立体異性体の混合物だったので、さらにHPLCで精製し、SK-IV-68-2(0.3 mg)とSK-IV-68-3(0.1 mg)を得た(それぞれの収率12%、4%)。HPLCの条件は次の通り。カラム: Develosil ODS-HG-5(直径10 mm×長さ25 cm、野村化学製)、移動相: 50%アセトニトリル-水、流速: 3 mL/分、検出器: 示差屈折計。

[0057] ここで、式(14)の化合物が第1中間体に相当し、式(15)の化合物が第2中間体に相当する。そして、式(17)の化合物が第3中間体に相当する。式(15)の化合物に反応させる第2反応試薬としては式(5)の化合物(R"がエチル基)を採用している。

[0058] 最終的に生成したステロイド誘導体はR₁~R₆は全てHであるが、式(11)から式(12)に変化させる工程にて反応させる糖として必要な置換基を導入したものを採用することでR₁~R₃の置換基に任意の置換基を導入できる。また、式(17)から式(18)に変化させる工程にて反応させる糖として必要な置換基を導入したものを採用することでR₄~R₆の置換基に任意の置換基を導入できる。

[0059] (NGF関連活性の測定)

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞は、理研セルバンクから入手した。

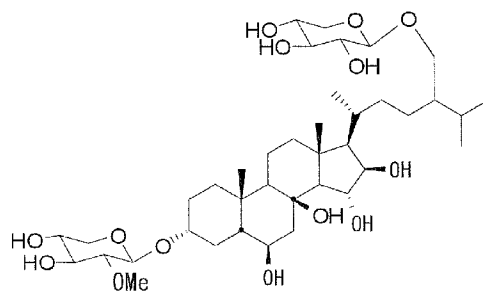
凍結保存細胞(2×10⁴細胞)を培地(MEME-10%牛胎児血清-5%馬血清)で洗浄し、培地10 mLとともに9 cmシャーレに撒き、5%CO₂雰囲気下、37℃、1週間静置培養した。細胞を収穫し新しい培地で2×10⁵細胞/シャーレになるように希釈して1週間培養する継代培養操作を4回以上繰返した後、収穫した細胞を試験に用いた(継代操作は12回まで)

。以下、培養とは5%CO₂雰囲気下、37℃で行うものとする。

[0060] 24穴マイクロプレートの各ウエルに、 2×10^4 細胞のPC12細胞を含む培地1mLを入れ、CO₂インキュベータ中、37℃で24時間静置培養した。培地を、適当な濃度のサンプルを含む無血清MEME培地1mL（1%DMSO含有）に交換し、24時間ごとに1週間、細胞の様子を観察した。計約100細胞が観察できる視野3つを無作為に選択し、突起長が細胞の長径より長い細胞数を計測して、その割合をパーセントに換算して、神経突起伸張率（%）とした。

[0061] サンプルを単独で添加した場合を神経突起伸長活性をNGF様活性の値とし、神経突起伸長の誘導が小さい濃度（1.0ng/mL）のNGFと共に添加した場合の神経突起伸長活性をNGF増強活性の値とした。サンプルの添加濃度は10μg/mL、20μg/mL、40μg/mLとした。対照試験として、特許文献1にて報告した化合物（acanthasteroside B3。特許文献1における化合物40Aに相当する。以下、単に「B3」と称する。：添加濃度は10μg/mL、20μg/mL、40μg/mL）及びNGF（添加濃度は1.0ng/mL、40ng/mL）についても測定を行った。各濃度について3回ずつ測定した。なお、何も加えない（0μM）場合には神経突起伸張率は0であった。結果を表1・図2（NGF様活性）及び表2・図3（NGF増強活性）に示す。

[0062] [化10]



acanthasteroside B3

[0063]

[表1]

	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
SK-IV-68-2 40 μ M	0	0	0	1	1	12
20 μ M	0	0	0	0	1	4
10 μ M	0	0	0	0	1	7
B3 40 μ M	0	0	0	0	0	5
B3 20 μ M	0	0	0	0	0	0
B3 10 μ M	0	0	0	1	0	6
NGF 40 ng/mL	1	5	20	30	50	71
NGF 1.0 ng/mL	3	6	22	27	17	25

(%)

[0064] [表2]

	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
SK-IV-68-2 40 μ M+NGF	1	7	38	72	67	70
20 μ M+NGF	3	14	25	32	46	68
10 μ M+NGF	0	14	22	36	68	58
SK-IV-68-3 40 μ M+NGF	0	5	26	29	60	74
20 μ M+NGF	1	6	20	21	37	30
10 μ M+NGF	0	7	27	29	34	27
B3 40 μ M+NGF	3	49	75	82	93	84
B3 20 μ M+NGF	2	10	28	45	52	40
B3 10 μ M+NGF	1	12	26	25	32	24
NGF 40 ng/mL	1	5	20	30	50	71
NGF 1.0 ng/mL	3	6	22	27	17	25
DMSO	0	0	0	0	0	0

(%)

[0065] 表1及び図2から明らかなように、SK-IV-68-2についてのNGF様活性はNGFよりは小さいもののB3よりも高い値を示した。特に6日目からの立ち上がりが期待できることが分かった。

[0066] 表2及び図3から明らかなように、SK-IV-68-2及び-3についてのNGF増強活性はNGF 1.0 ng/mL及び40 ng/mLの場合よりも高くなり、B3よりも僅かに低いものの高い値を示すことが分かった。

[0067] (ステロイド誘導体の合成：その2)

ステロイド誘導体合成方法(その1)に対して収率を40倍程度にまで向上できる方法を以下に示す。

[0068] 図4に示す経路にて化合物(Aa)に相当する、MO-IV-52-1を合成した。MO-IV-52-1は図4に示すように、24位の炭素原子における立体異性体の約1:1の混合物である。

[0069] コール酸ナトリウム 1.3 gをDMF(10 mL)に溶解し、ヨウ化メチル 0.37 mLを加え、室温で15時間攪拌することにより、コール酸メチル 1.2 gを得た(収率97%)。

- [0070] コール酸メチル 4.0 g を無水ジクロロメタン 60 mL に溶解し、2, 6-ルチジン 5.0 mL とトリエチルシリルトリフラート (TESOTf) 7.7 mL を加えて、室温で 1.5 時間攪拌することにより化合物 (10A) 7.2 g を得た (収率 100%)。なお、TES はトリエチルシリル基を表す。
- [0071] 化合物 (10A) 217 mg をテトラヒドロフラン 4.2 mL に溶解し、46% フッ化水素酸 0.38 mL を加えて、室温で 20 分間攪拌することにより化合物 (11A) 175 mg を得た (収率 95%)。
- [0072] 化合物 (11A) 315 mg、シアン化水銀 172 mg、臭化水銀 245 mg を無水アセトニトリル 10 mL に溶解し、2, 3, 4-トリ-O-アセチル- α -D-ブロモキシロース 214 mg を加えて、室温で 30 分間攪拌することにより化合物 (12A) 314 mg を得た (収率 72%)。
- [0073] 化合物 (12A) 1.4 g をメタノール 36 mL に溶解し、炭酸カリウム 1.3 g を加え、室温で 1 時間攪拌することによりトリオール 1.2 g を得た (収率 97%)。このトリオール 1.1 g を無水ジクロロメタン 15 mL に溶解し、2, 6-ルチジン 1.0 mL と t-ブチルジメチルシリルトリフラート (TBSOTf) 1.5 mL を加えて、室温で 4 時間攪拌することにより化合物 (13A) 1.7 g を得た (収率 100%)。
- [0074] 化合物 (13A) 1.7 g をメタノール (49 mL) とテトラヒドロフラン (30 mL) の混合溶媒に溶解し、水酸化リチウム一水和物 3.8 g を水 26 mL に溶解した溶液を滴下した。この混合物を 50°C で 3 時間攪拌した後、1 N 塩酸 120 mL で処理することにより粗カルボン酸 1.5 g を得た。この粗カルボン酸 1.5 g を無水ジクロロメタン 36 mL に溶解し、1, 1-カルボニルジイミダゾール (Im_2CO) 452 mg を加えて室温で 1 時間攪拌した。この混合物に N, O-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩 406 mg を加え、室温で 23 時間攪拌することにより化合物 (14A) 1.5 g を得た (2 段階の収率 86%)。
- [0075] 化合物 (14A) 713 mg を無水テトラヒドロフラン 7.4 mL に溶解し、0°C で塩化イソプロピルマグネシウム (Me_2CHMgX における X が C

1 の化合物) のテトラヒドロフラン溶液 (2 M) 1. 9 mL をゆっくり滴下し、室温に昇温しながら 2 時間攪拌することにより化合物 (15 A) 429 mg を得た (収率 61%)。

[0076] 無水テトラヒドロフラン 1. 4 mL にリチウムヘキサミチルジシラジドのテトラヒドロフラン溶液 (1. 0 M) 0. 55 mL を加え、 -78°C に冷却し、無水酢酸エチル (EtOAc) 0. 055 mL を滴下して 15 分攪拌した。この混合物に化合物 (15 A) 125 mg のテトラヒドロフラン溶液 (1. 4 mL) を滴下し、 -78°C で 1. 5 時間攪拌することにより化合物 (16 A) 129 mg を得た (収率 95%)。

[0077] 無水ピリジン 7. 2 mL に塩化チオニル 0. 85 mL を加え室温で 40 分攪拌した後、 0°C に冷却した。ここに化合物 (16 A) 822 mg の無水ジクロロメタン溶液 (8. 9 mL) を滴下し、 0°C で 20 分間攪拌することにより、脱水化合物の粗生成物 829 mg を得た。次いで、無水テトラヒドロフラン 11 mL に水素化アルミニウムリチウムのテトラヒドロフラン溶液 (2. 0 M) 1. 1 mL を加え、 0°C に冷却後、前述の脱水化合物 852 mg のテトラヒドロフラン溶液 (13 mL) をゆっくり滴下した。この混合物を室温で 1 時間攪拌することにより粗アルコール 565 mg を得た。次いで、この粗アルコール 565 mg を酢酸エチル 16 mL に溶解し、白金黒 85 mg を加え、水素雰囲気下、室温で 48 時間攪拌した。触媒をろ別した後、得られた粗生成物 (ほぼ未反応の原料) に対し再度、白金黒 113 mg を用いて接触還元を行うことにより化合物 (17 A) 519 mg を得た (3 段階の収率 64%)。

[0078] 化合物 (17 A) 92 mg、シアン化水銀 35 mg、臭化水銀 49 mg を無水ジクロロメタン 1. 8 mL と無水アセトニトリル 1. 8 mL の混合溶媒に溶解し、1, 1, 3, 3-テトラメチルウレア (TMU) 4. 8 μL を加えた後、2, 3, 4-トリ-*O*-ピバロイル- α -ブロモキシロース 55 mg を加えて、室温で 1 時間攪拌することにより化合物 (18 A) 93 mg を得た (収率 76%)。

- [0079] 化合物（18A）146mgを無水エーテル3.9mLに溶解し、0℃に冷却し、水素化ジイソブチルアルミニウムのトルエン溶液（1.5M）0.94mLを加え、0℃で2時間攪拌することにより粗生成物89mgを得た。この粗生成物89mgをテトラヒドロフラン0.7mLに溶解し、フッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液（1M）0.7mLを加え、50℃で16時間攪拌することにより化合物（A）（nは2）47mgを得た（2段階の収率68%）。この化合物は24位の炭素原子における立体異性体の約1：1の混合物である。
- [0080] ここで、式（14A）の化合物が第1中間体に相当し、式（15A）の化合物が第2中間体に相当する。そして、式（17A）の化合物が第3中間体に相当する。式（15A）の化合物に反応させる第2反応試薬としては式（5）の化合物（R''がエチル基）を採用している。
- [0081] 最終的に生成したステロイド誘導体はR₁～R₆は全てHであるが、式（11A）から式（12A）に変化させる工程にて反応させる糖として必要な置換基を導入したものを採用することでR₁～R₃の置換基に任意の置換基を導入できる。また、式（17A）から式（18A）に変化させる工程にて反応させる糖として必要な置換基を導入したものを採用することでR₄～R₆の置換基に任意の置換基を導入できる。
- [0082] （動物実験）
- マウス：15ヶ月齢のICR系雄性マウス（加齢マウス）、若齢対照として8週齢の同マウス（若齢マウス）を日本SLC（株）から購入し使用した。
- [0083] 投与：ステロイド誘導体（MO-I V-52-1）を、体重10gあたり0.1mLの割合でマウスに投与したときに、ステロイド誘導体の投与量がマウスの体重基準で1mg/kg（M1）または10mg/kg（M10）になるように調製した溶液（ジメチルスルホキシド（DMSO）を1質量%含有）を14日間毎日、皮下投与した。対照試験としてDMSOの1質量%水溶液を同様に皮下投与した。
- [0084] 行動実験：実験13日目にオープンフィールド試験による行動観察を行っ

た結果、ステロイド誘導体の投与の有無による顕著な行動変化は認められなかった。その後、実験 14 日目に Y 字型迷路実験、14 及び 15 日目に新奇物体認知試験を行った。

[0085] Y 字型迷路実験は木製の Y 字型の迷路（上部幅 10 cm、下部幅 3 cm、高さ 12 cm、長さ 40 cm のアームの一端を閉じて行き止まりとし、開放された端部を放射状（隣接するアームとの角度が 120° ）に接続してあり、その内部を自由に行き来できるようにしてある。内側は黒く塗ってある。）の中を自由に探索行動させ、次に侵入するアームが直近の過去 2 回侵入したアームと異なる率を交替行動率（Alternation behavior（%））として記録し、短期記憶の指標とした。

[0086] 新奇物体認知試験は灰色アクリル製の箱（縦 30 cm、幅 30 cm、高さ 35 cm）を用いて行った。訓練試行時（14 日目）と 24 時間後の保持試行時（15 日目）とで異なる物体に接触させ、保持試行時における全接触時間あたりの新奇物体に対する接触時間の割合を算出した。訓練試行時には木製の青色三角柱と赤色四角錐とに接触させ、保持試行時には赤色四角錐を黒色のゴルフボールに置き換えて試験を行った。

[0087] 結果（Y 字型迷路実験）：加齢マウスの対照群が低い交替行動率を示すのに対し、投与群では有意に改善し、若齢マウスと同等のレベルを示した（図 5）。若齢マウスに投与しても効果が見られないように見えるが、これは 70% 付近が頭打ち（天井効果）である（100% は一定方向に回転する異常行動）。天然ステロイド配糖体（acanthasteroside B3 : B3）についても同様に Y 字型迷路実験を行った結果（図 6）と比較すると、MO-I V-52-1 では 1mg/kg の低い投与量でも効果を示すのに対し、天然ステロイド配糖体（B3）では 1mg/kg を超えた濃度で効果を示すことから、合成品の効果が天然物より高いことが示唆される。

[0088] 結果（新奇物体認知試験）：結果を図 7 に示す。全てのマウスについて訓練試行時には青色三角柱と赤色四角錐とのそれぞれについて同程度に接触したことから、嗜好性に偏りが少なく、試験に用いる物体として適正なもので

あることが推認された。

保持試行時には新奇物体である黒色のゴルフボールへの接触時間の割合は、加齢マウス（対照群）では、ほぼ50%とほとんど変化がなかったのに対し、加齢マウス（10mg/kg投与群）では若いマウスと同程度にまで向上し、認知記憶障害の改善効果が推認された。加齢マウス（1mg/kg投与）では対照群よりも新奇物体への接触時間の割合の割合は僅かに増加し、若干の効果が推認された。なお、若齢マウス（10mg/kg投与群）の結果が若齢マウス（対照群）と同程度であることから、若齢マウスにおける認知記憶力増強効果については効果を認めることはできなかった。

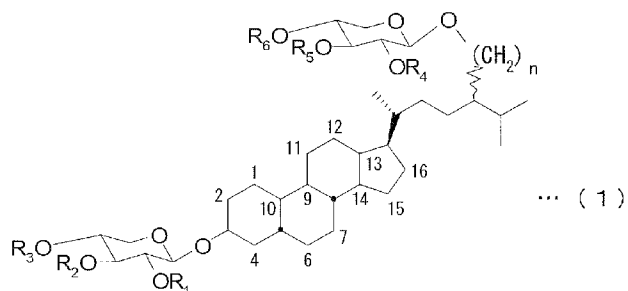
産業上の利用可能性

- [0089] 本発明の新規ステロイド誘導体はNGF関連活性などの発現が期待できる。NGF関連活性を有する物質は薬理作用として痴呆治療、学習能力向上などに有効な作用を発揮することが期待され、薬剤としての応用が期待できる。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（１）で示される化合物である新規ステロイド誘導体。

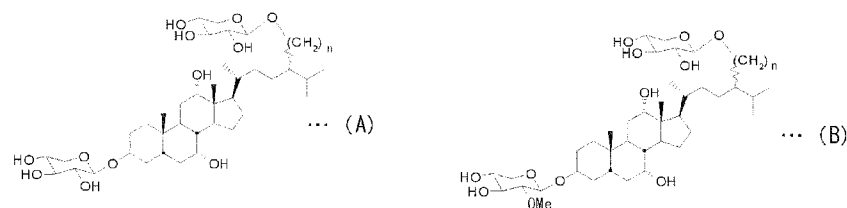
[化1]



（式（１）中、 $R_1 \sim R_6$ は水素又はアルキル基から全て独立して選択可能な官能基であり、同一であっても異なるものであっても良い。 n は１又は２である。ステロイド骨格中の１、２、４～１６位の炭素原子に結合する水素元素のうちの１つ以上をメチル基、OH基、又はメトキシ基に置換できる。）

[請求項2] 前記一般式（１）に記載の化合物は、下記式（A）又は（B）である請求項１に記載の新規ステロイド誘導体。

[化2]



（式（A）、（B）中の n は１又は２）

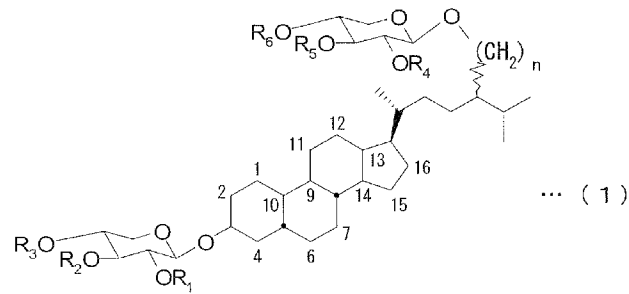
[請求項3] 下記一般式（１）で示される化合物である新規ステロイド誘導体を製造する方法であって、

下記一般式（２）で示される第１中間体に対し、 Me_2CHMgX （ X はCl又はBr）で表される第１反応試薬を反応させ、一般式（３）で表される第２中間体を得る工程と、

前記第２中間体から最終生成物とする工程と、

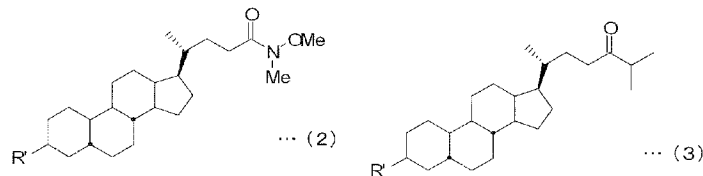
を有することを特徴とする新規ステロイド誘導体の製造方法。

[化3]



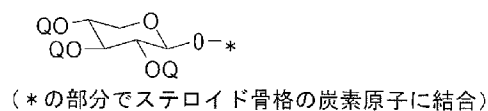
(式(1)中、 $R_1 \sim R_6$ は水素又はアルキル基から全て独立して選択可能な官能基であり、同一であっても異なるものであっても良い。 n は1又は2である。ステロイド骨格中の1、2、4～16位の炭素原子に結合する水素元素のうちの1つ以上をメチル基、OH基、又はメトキシ基に置換できる。)

[化4]



式(2)及び(3)で示された化合物がもつステロイド骨格中、前記一般式(1)と対応する位置に同じ置換基をもつ。但し、OH基をもつ場合にはOQ基が代わりに導入される。； R' はOQ基、OH、又は、

[化5]



である。；Qは水酸基の保護基であり、全て同一であるか、又は、異なるものがある基である。)

[請求項4]

下記一般式(1)で示される化合物である新規ステロイド誘導体を製造する方法であって、

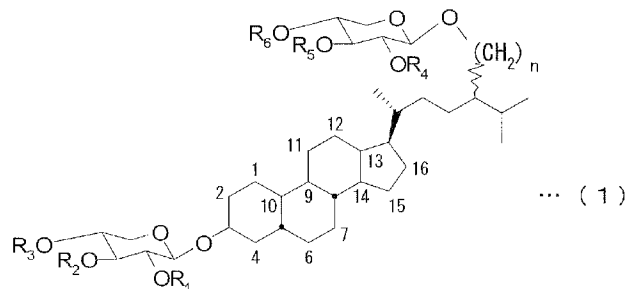
下記一般式(3)で示される第2中間体に対し、下記一般式(5)

～（８）で表される化合物のうちの１つである第２反応試薬を反応させ、一般式（４）で表される第３中間体を得る工程と、

前記第３中間体から最終生成物とする工程と、

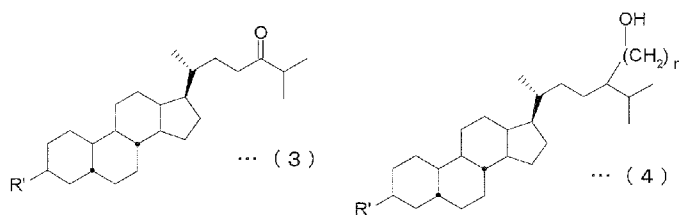
を有することを特徴とする新規ステロイド誘導体の製造方法。

[化6]



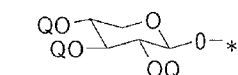
（式（１）中、 $R_1 \sim R_6$ は水素又はアルキル基から全て独立して選択可能な官能基であり、同一であっても異なるものであっても良い。 n は１又は２である。ステロイド骨格中の１、２、４～１６位の炭素原子に結合する水素元素のうちの１つ以上をメチル基、OH基、又はメトキシ基に置換できる。）

[化7]



（式（３）及び（４）で示された化合物がもつステロイド骨格中、前記一般式（１）と対応する位置に同じ置換基をもつ。但し、OH基をもつ場合にはOQ基が代わりに導入される。； R' はOQ基、OH、又は、

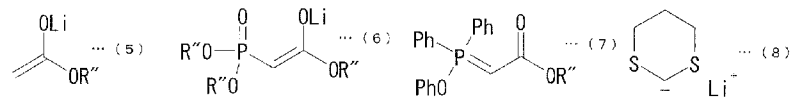
[化8]



（*の部分でステロイド骨格の炭素原子に結合）

である。；式（３）及び（４）中、Ｑは水酸基の保護基であり、全て同一であるか、又は、異なるものがある基である。；前記第２反応試薬として、式（５）～（７）のうちの何れかを選択する場合には、 n が２、式（８）の化合物を選択する場合には n が１である。）

[化9]

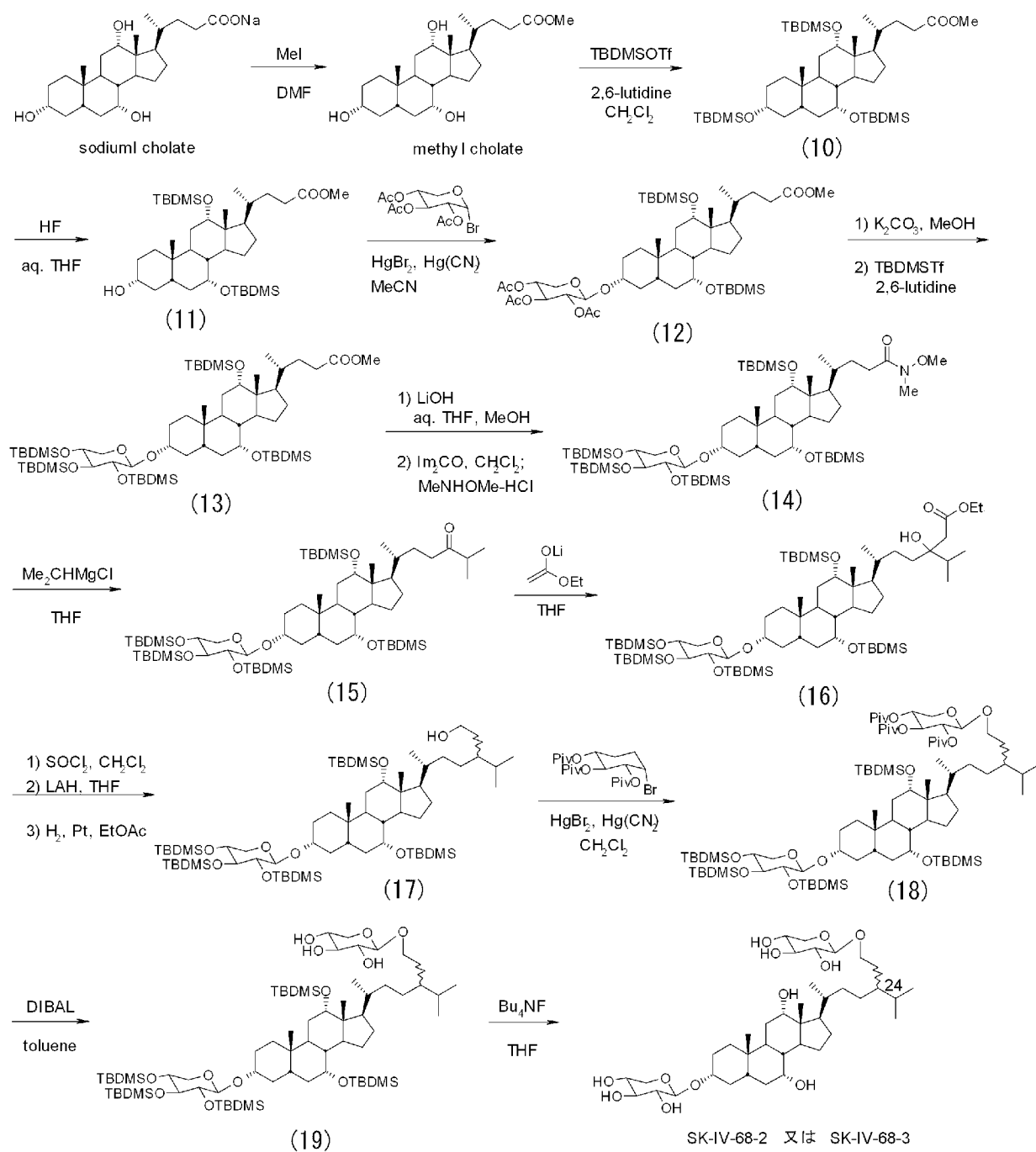


（式（５）～（７）中、 R'' はアルキル基から独立して選択可能である。）

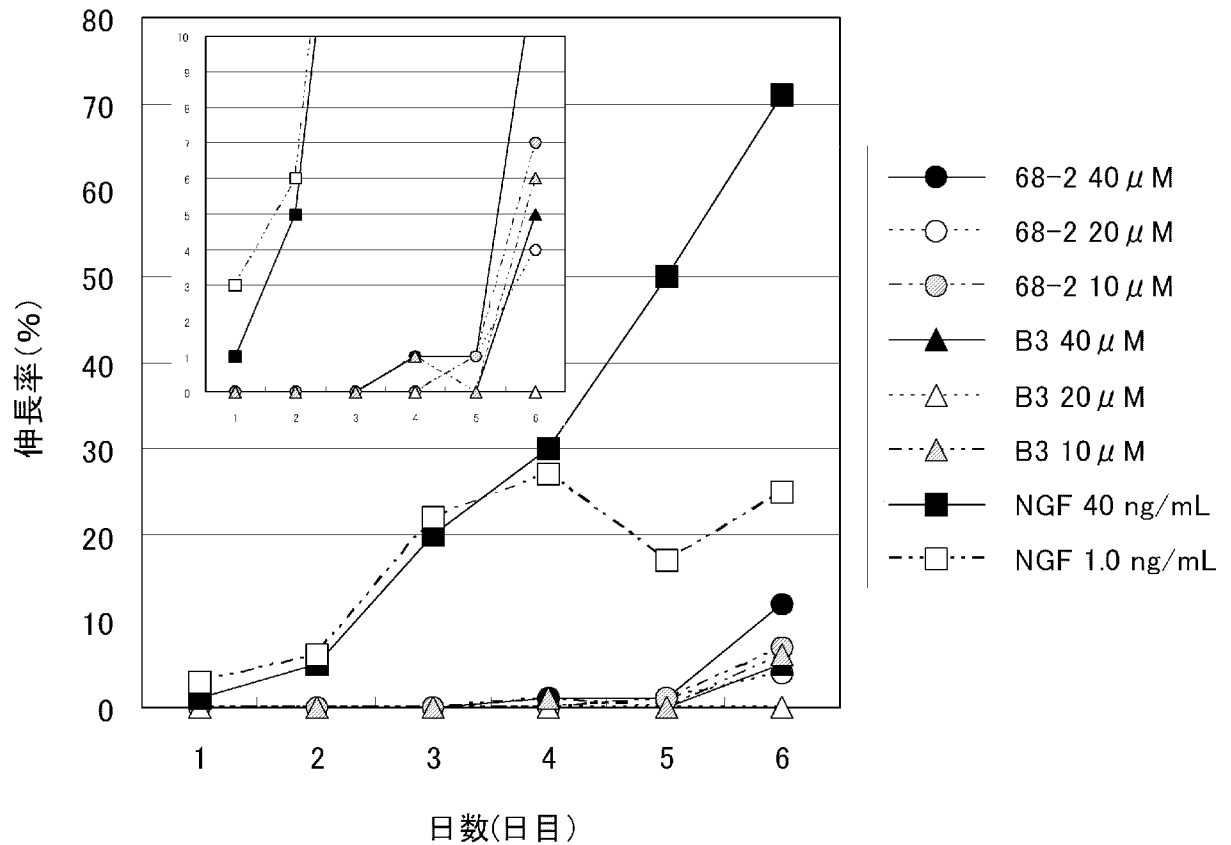
[請求項5] 請求項１に記載の新規ステロイド誘導体、医薬上許容できるそのエステル又はそのプロドラッグを含有する医薬。

[請求項6] N G F 関連活性を発現することにより作用する請求項５に記載の医薬。

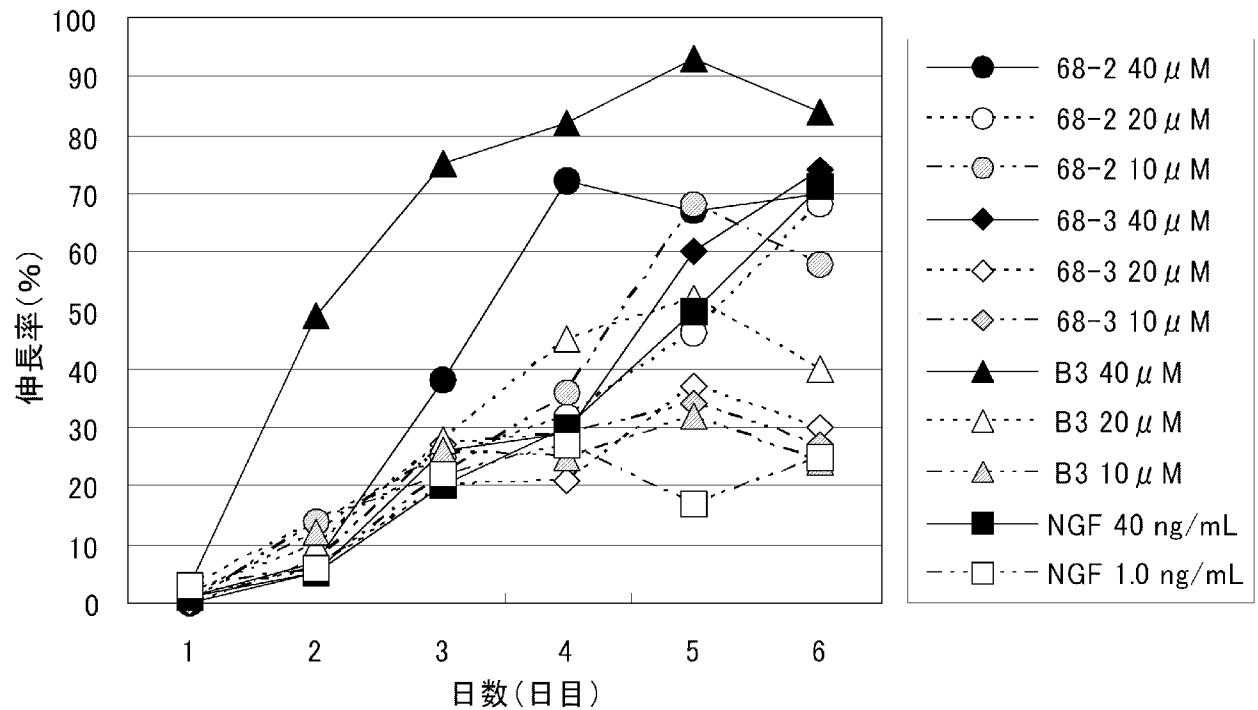
[図1]



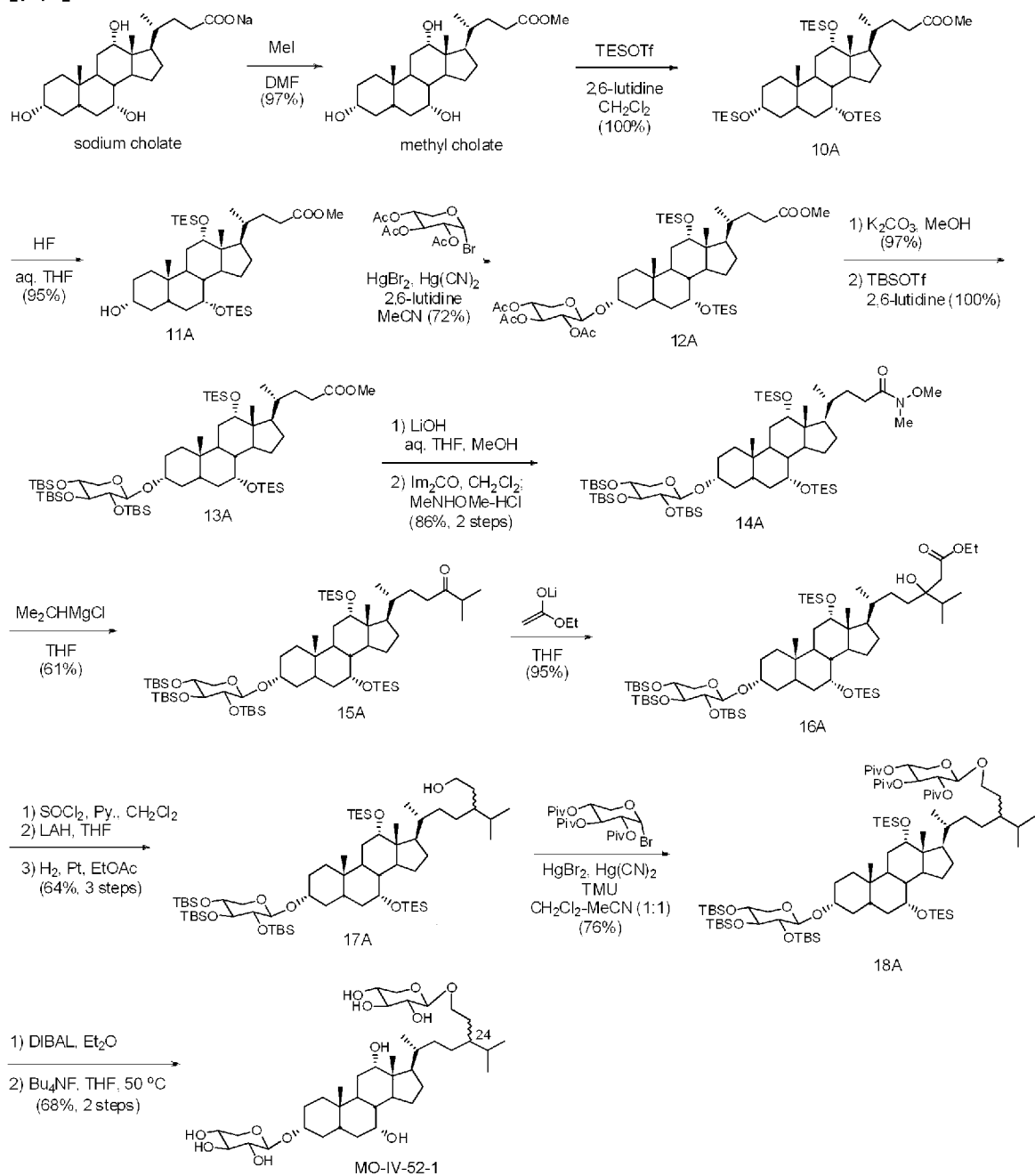
[図2]



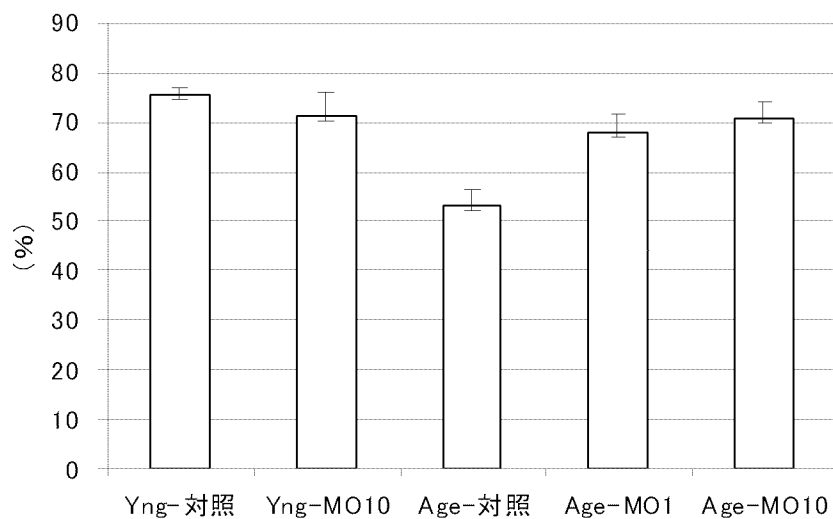
[図3]



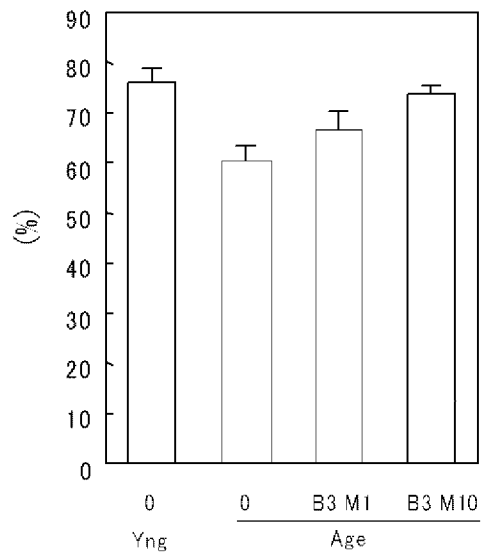
[図4]



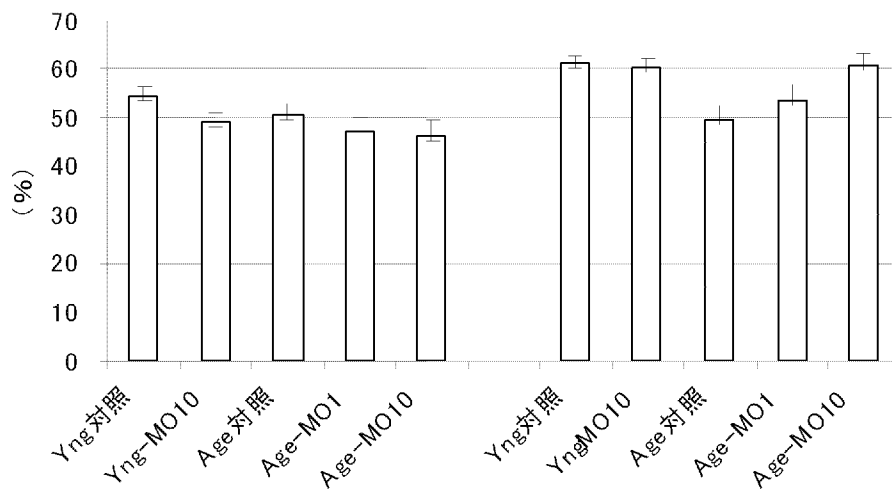
[図5]



[图6]



[图7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07J17/00 (2006.01) i, A61P25/28 (2006.01) i, A61P43/00 (2006.01) i

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)

C07J17/00, A61P25/28, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

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

CAPLUS (STN), CASREACT (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JDreamII),

JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2006/090910 A1 (Nagoya University), 31 August 2006 (31.08.2006), claims 1 to 4, 17; acanthasteroside 40A; acanthasteroside 39A4 (Family: none)	1, 2, 5, 6 3, 4
A	WANG, W., Cytotoxic Sterols and Saponins from the Starfish Certonardoa semiregularis, Journal of Natural Products, 2004, 67(4), p. 584-591	1-6
A	QI, J., Linckosides C-E, three new neuritogenic steroid glycosides from the Okinawan starfish Linckia laevigata, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12(15), p. 4259-4265	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 March, 2010 (24.03.10)

Date of mailing of the international search report

06 April, 2010 (06.04.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052656

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	QI, J., Linckosides A and B, Two New Neuritogenic Steroid Glycosides from the Okinawan Starfish Linckia laevigata, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10(6), p. 1961-1966	1-6
P,X	Shiro KAMATA, "Shinkei Seicho Inshiyo Kassei o Shimesu Steroid Haitotai no Kaihatsu", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2009 Nendo (Heisei 21 Nendo) Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2009 (05.03.2009), page 183	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052656

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

The inventions in claims 1, 5 and 6 do not have any special technical feature, since the inventions are described in the following document 1 and cannot be considered to be novel.

Document 1: WO 2006/090910 A1

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07J17/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. C07J17/00, A61P25/28, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus(STN), CASREACT(STN), REGISTRY(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	WO 2006/090910 A1 (国立大学法人名古屋大学) 2006.08.31, 請求の 範囲 1 - 4, 1 7、アカンタステロサイド 40A、アカンタステロサイ ド 39A4 (ファミリーなし)	1, 2, 5, 6 3, 4
A	WANG, W., Cytotoxic Sterols and Saponins from the Starfish Certonardoa semiregularis, Journal of Natural Products, 2004, 67(4), p. 584-591	1-6
A	QI, J., Linckosides C-E, three new neuritogenic steroid	1-6

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 3 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 6 . 0 4 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

早乙女 智美

4 P

3 7 5 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2

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
	glycosides from the Okinawan starfish <i>Linckia laevigata</i> , Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12(15), p. 4259-4265	
A	QI, J., Linckosides A and B, Two New Neuritogenic Steroid Glycosides from the Okinawan Starfish <i>Linckia laevigata</i> , Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10(6), p. 1961-1966	1-6
P X	鎌田司郎, 神経成長因子様活性を示すステロイド配糖体の開発, 日 本農芸化学会 2009 年度(平成 21 年度)大会講演要旨集, 2009. 03. 05, p. 183	1-6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求項1, 5及び6に係る発明は、以下の文献1に記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

文献1 : WO 2006/090910 A1

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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