

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 9 月 26 日 (26.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/074792 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 5/083, THE PROMOTION OF SCIENCE) [JP/JP]; 〒102-8471 東京都千代田区麹町5丁目3番1号 Tokyo (JP).  
5/087, C12P 21/02, C12N 1/14
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/02590 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大村 智 (OMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒108-8641 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里学園北里大学 大学院薬学研究科内 Tokyo (JP). 供田 洋 (TOMODA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 社団法人北里研究所内 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 3 月 19 日 (19.03.2002)
- (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: (74) 代理人: 小林 和憲 (KOBAYASHI, Kazunori); 〒170-0004 東京都豊島区北大塚2丁目2番1号 太陽生命大塚ビル3階 Tokyo (JP).  
特願2001-80388 2001 年 3 月 21 日 (21.03.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人北里学園 (GAKKOU HOUJIN KITASATO GAKUEN) [JP/JP]; 〒108-8641 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo (JP). 日本学術振興会 (JAPAN SOCIETY FOR
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: FO-6979 SUBSTANCES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: FO-6979 類物質及びそれらの製造法

(57) Abstract: (*Beauveria*) sp. FO-6979 (FERM BP-6681), which belongs to the genus *Beauveria* and is capable of producing FO-6979-M0, -M1, -M2, -M3 and -M4 substances, is cultured in a medium to thereby accumulate the FO-6979-M0, -M1, -M2, -M3 and -M4 substances in the liquid culture medium. Then the FO-6979-M0, -M1, -M2, -M3 and -M4 substances are collected from the culture medium. The substances thus obtained are less toxic, specifically inhibit acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase, and inhibit the formation of oil droplets in macrophages. Owing to these characteristics, the above substances are useful in preventing and treating human diseases caused by cholesterol accumulation.

(57) 要約:

本発明は、ボーベリア属に属し、FO-6979-M0 物質、-M1 物質、-M2 物質、-M3 物質及び-M4 物質を生産する能力を有するボーベリアエスピー FO-6979 (FERM BP-6681) を培地に培養し、培養液中に該 FO-6979-M0 物質、-M1 物質、-M2 物質、-M3 物質及び-M4 物質を蓄積せしめ、該培養物から FO-6979-M0 物質、-M1 物質、-M2 物質、-M3 物質及び-M4 物質を採取する。得られた物質は毒性が低くアシルコエンザイム A コレステロールアシル転移酵素を特異的に阻害し、マクロファージ内での油滴形成を阻害することから、ヒトのコレステロール蓄積に起因する疾病の予防および治療に有用である。

WO 02/074792 A1



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特  
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## F O - 6 9 7 9 類物質及びそれらの製造法

## 技術分野

本発明はアシルコエンザイム A コレステロールアシル転移酵素阻害作用を有する F O - 6 9 7 9 類物質及びそれらの製造法に関する。

本発明において、F O - 6 9 7 9 類物質とは F O - 6 9 7 9 - M 0 物質、F O - 6 9 7 9 - M 1 物質、F O - 6 9 7 9 - M 2 物質、F O - 6 9 7 9 - M 3 物質及び F O - 6 9 7 9 - M 4 物質を包含するものである。

## 背景技術

近年、食生活の向上に伴い成人の高脂血症や動脈硬化などコレステロール蓄積に起因する症状が現代病として問題視されている。コレステロールはアシルコエンザイム A のアシル基転位によりコレステロールエステルとなり、細胞内および血中リポ蛋白に蓄積される。このアシル基転位反応を触媒する酵素がアシルコエンザイム A コレステロールアシル転移酵素であり、コレステロールの腸管からの吸収、肝臓でのリポタンパク質生成および冠動脈における泡沫細胞の形成に深くかかわっている (S l i s k o v i c, D. R. と W h i t e, A. D. T r e n d P h a r m. S c i. 12 巻、194~199 頁、1991 年)。

従って、アシルコエンザイム A コレステロールアシル転移酵素を阻害する物質は、かかる疾病に有効であることが推察される。

## 発明の開示

このような作用機構に基づく医薬品の開発が望まれており、かかる実情において、アシルコエンザイム A コレステロールアシル転移酵素阻害活性を有する物質を提供することは、高脂血症やそれに基づく動脈硬化などの成人病の新しい予防

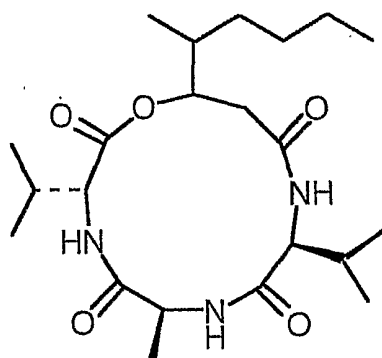
および治療法を提供するものであり有用なことである。

本発明者らは、微生物の生産する代謝産物について研究を続けた結果、土壌から分離したF O - 6 9 7 9 株の培養中にアシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素阻害活性を有する物質が産生されることを既に見出した。本発明者らは該物質をF O - 6 9 7 9 物質と命名し、該物質を新規F O - 6 9 7 9 物質およびその製造法として出願した（特開平11-279195号公報参照）。

そして、更に本発明者らは本F O - 6 9 7 9 株の代謝産物について研究を続けた結果、F O - 6 9 7 9 株の培養物中に新たにアシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素阻害活性を有する物質が産生されることを見出した。次いで、該培養物から該アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素阻害活性物質を分離、精製した結果、このような化学構造を有する物質は従来まったく知られていないことから、本物質をF O - 6 9 7 9 - M 0 物質、F O - 6 9 7 9 - M 1 物質、F O - 6 9 7 9 - M 2 物質、F O - 6 9 7 9 - M 3 物質及びF O - 6 9 7 9 - M 4 物質（以下F O - 6 9 7 9 類物質またはF O - 6 9 7 9 物質、-M 0 物質、-M 1 物質、-M 2 物質、-M 3 物質及びM 4 物質と総称することもある）と称することにした。

本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものであり、本物質がアシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素阻害活性を有し、マクロファージ内での油滴形成を阻害することにより、高脂血症やそれに基づく動脈硬化などの成人病の新しい予防に大いに期待されるものである。

本発明は、下記式 [ I ]



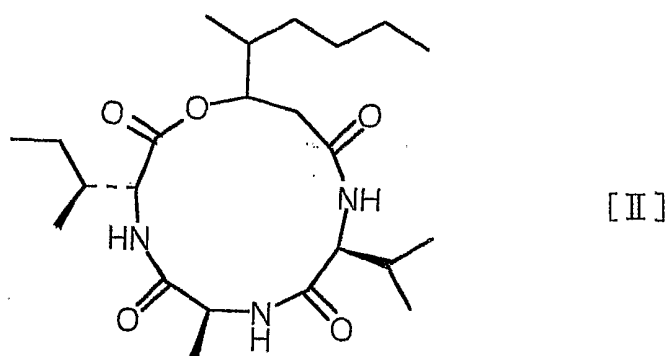
[ I ]

で表される化合物である新規FO-6979-M0物質を提供するものである。

本発明はさらに、ボーベリア属に属し、FO-6979-M0物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M0物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M0物質を採取する新規FO-6979-M0物質の製造法を提供するものである。

本発明のFO-6979-M0物質を生産する能力を有する微生物は、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) が用いられ、得られた物質はアシルコエンザイム A コレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有し、またコレステリルエステル生成に対する阻害作用およびマクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有するものである。

本発明はさらに、下記式 [II]



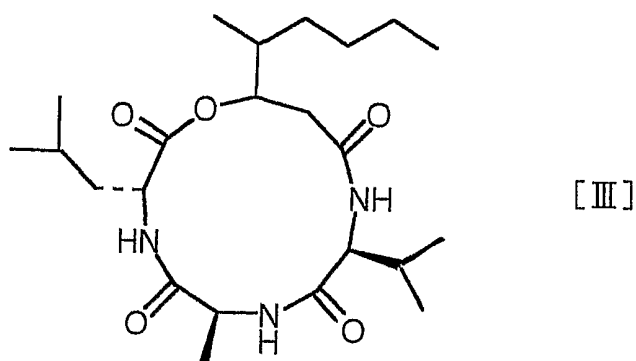
で表される化合物である新規FO-6979-M1物質を提供するものである。

本発明はさらに、ボーベリア属に属し、FO-6979-M1物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M1物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M1物質を採取する新規FO-6979-M1物質の製造法を提供するものである。

本発明のFO-6979-M1物質を生産する能力を有する微生物は、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) が用いられ、得られた物質はアシルコエンザイム

Aコレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有し、またコレステリルエステル生成に対する阻害作用およびマクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有するものである。

本発明はさらに、下記式〔Ⅲ〕

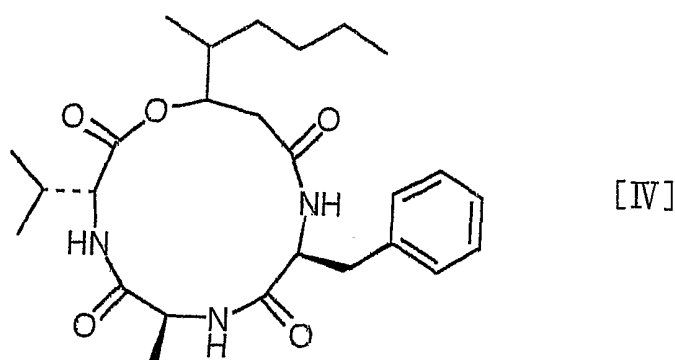


で表される化合物である新規FO-6979-M2物質を提供するものである。

本発明はさらに、ボーベリア属に属し、FO-6979-M2物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M2物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M2物質を採取する新規FO-6979-M2物質の製造法を提供するものである。

本発明のFO-6979-M2物質を生産する能力を有する微生物は、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) が用いられ、得られた物質はアシルコエンザイム Aコレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有し、またコレステリルエステル生成に対する阻害作用およびマクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有するものである。

本発明はさらに、下記式〔Ⅳ〕

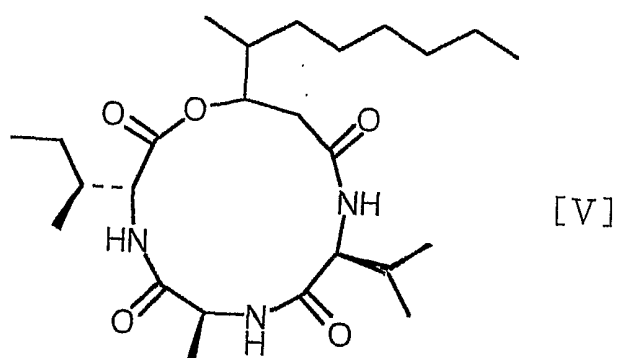


で表される化合物である新規FO-6979-M3物質を提供するものである。

本発明はさらに、ボーベリア属に属し、FO-6979-M3物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M3物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M3物質を採取する新規FO-6979-M3物質の製造法を提供するものである。

本発明のFO-6979-M3物質を生産する能力を有する微生物は、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) が用いられ、得られた物質はアシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有し、またコレステリルエステル生成に対する阻害作用およびマクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有するものである。

本発明はさらに、下記式[V]



で表される化合物である新規FO-6979-M4物質を提供するものである。

本発明はさらに、ボーベリア属に属し、FO-6979-M4物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M4物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M4物質を採取する新規FO-6979-M4物質の製造法を提供するものである。

本発明のFO-6979-M4物質を生産する能力を有する微生物は、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) が用いられ、得られた物質はアシルコエンザイム A コレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有し、またコレステリルエステル生成に対する阻害作用およびマクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有するものである。

前記のFO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質を生産する能力を有する微生物（以下、「FO-6979物質生産菌」と称する）は、ボーベリア属に属するが、例えば本発明者らが土壌から分離したボーベリア エスピー (*Beauveria* sp.) FO-6979株は、本発明において最も有効に使用される株の一例である。本FO-6979株の菌学的性状を示すと以下の通りである。

## 1. 形態的性質

本菌株は、バレイショ・ブドウ糖寒天培地、コーン・ミール寒天培地、麦芽汁寒天培地、三浦寒天培地などで良好に生育し、分生子の着生も良好である。また、イーストエキストラクト・ソルブルスターチ寒天培地での生育は良好であるが、分生子の着生は観察されなかった。コーン・ミール寒天培地に生育したコロニーを顕微鏡で観察すると、菌糸は透明で隔壁を有している。分生子柄は基底菌糸より直接、あるいは短い枝から生じる。分生子柄の基部は球状あるいはフラスコ状に膨らんで大きさ $2.0 \sim 3.3 \times 2.5 \sim 3.7 \mu\text{m}$ となる。先端は細く伸長し、分生子形成にしたがってジグザグ状になり、長さ $12 \sim 20 \mu\text{m}$ となる。分生子は分生子柄の小突起（約 $1 \mu\text{m}$ ）上に出芽形成し、球形あるいは、幅広い

楕円形でときに基部はとがり、無色で大きさ  $1.8 \sim 2.5 \times 2.5 \sim 3.3 \mu\text{m}$  である。

## 2. 各種培地上での培養性状

本菌株を各種寒天培地上で  $25^{\circ}\text{C}$ 、14日間培養した場合の肉眼的に観察した結果は下記に示すとおりである。なお、下記の培地において、菌核または菌核様の構造は形成されない。

| 培地             | 培地上の生育状態<br>(コロニーの直径)              | コロニー表<br>面の色調 | コロニー裏<br>面の色調 | 可溶性<br>色素 |
|----------------|------------------------------------|---------------|---------------|-----------|
| バレイショ・ブドウ糖寒天培地 | 良好 (4.0 mm)<br>羊毛状、周辺一部隆起、<br>周辺平滑 | 白色            | 淡黄白色          | 無し        |
| コーン・ミール寒天培地    | 良好 (5.4 mm)<br>羊毛状、平坦、<br>周辺乱糸状    | 白色            | 淡黄白色～<br>薄橙色  | 無し        |
| 麦芽汁寒天培地        | 良好 (3.2 mm)<br>羊毛状、中央隆起、<br>周辺平滑   | 白色            | 薄茶色           | 無し        |

## 三浦寒天培地

|            |    |    |    |
|------------|----|----|----|
| 良好 (60 mm) | 白色 | 白色 | 無し |
| 粉状、平坦、     |    |    |    |
| 周辺平滑       |    |    |    |

## イーストエクストラクト・ソルブルスターチ寒天培地

|            |    |       |    |
|------------|----|-------|----|
| 良好 (53 mm) | 白色 | 淡黄白色～ | 無し |
| ビロード状、隆起、  |    | 薄橙色   |    |
| 周辺平滑       |    |       |    |

## 3. 生理的、生態的性状

## (1) 最適生育条件

本菌株の最適生育条件は、pH 4～7、温度 15～30℃である。

## (2) 生育範囲

本菌株の生育範囲は、pH 4～10、温度 11～32℃である。

## (3) 好気性、嫌気性の区別      好気性

以上のように、本菌株 FO-6979 株の形態的特徴、培養性状および生理的性状に基づき、既知菌種との比較を試みた結果、本菌株はボーベリア (Beauveria) 属に属する一菌株と同定し、ボーベリア エスピー FO-6979 と命名した。本菌株はボーベリア エスピー FO-6979 (Beauveria sp. FO-6979) として、平成 10 年 3 月 18 日に日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号に在する工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-16716 として寄託された。その後、本菌株は平成 11 年 3 月 16 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求が、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) [AIST Ts

ukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome  
Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] に在する独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) により受領された。受託番号はFERM BP-6681。

本発明で使用されるFO-6979物質生産菌は、前述のボーベリア エスピー (Beauveria sp.) FO-6979菌株が好ましい例として挙げられるが、菌の一般的性状として菌学上の性状は極めて変異し易く、一定したものではなく、自然的にあるいは通常行われる紫外線照射または変異誘導体、例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホネート等を用いる人工的変異手段により変異することは周知の事実であり、このような人工的変異株は勿論、自然変異株も含め、ボーベリア属に属し、FO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質を生産する能力を有する菌株はすべて本発明に使用することができる。また、細胞融合、遺伝子操作などの細胞工学的に変異させた菌株も含め、ボーベリア属に属し、FO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質を生産する菌株は、全て本発明において使用することができる。

本発明を実施するに当たっては、先ずボーベリア属に属するFO-6979物質生産菌を培地に培養することにより行われる。上記FO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質生産に適した栄養源としては、微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらに必要に応じて無機塩、ビタミン等を含有させた栄養培地が使用される。

炭素源としてはグルコース、フラクトース、マルトース、ラクトース、ガラク

トース、デキストリン、澱粉等の糖類、大豆油等の植物性油脂類が単独または組み合わせて用いられる。

窒素源としては、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆粉、綿実粉、コーン・スチープ・リカー、麦芽エキス、カゼイン、アミノ酸、尿素、アンモニウム塩類、硝酸塩類等が単独または組み合わせて用いられる。その他必要に応じてリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等の塩類、鉄塩、マンガン塩、銅塩、コバルト塩、亜鉛塩などの重金属塩類やビタミン類、その他本F O - 6 9 7 9 - M 0 物質、- M 1 物質、- M 2 物質、- M 3 物質及び- M 4 物質の生産に好適なものが適宜添加される。

培養するに当たり、発泡の激しいときには、必要に応じて液体パラフィン、動物油、植物油、シリコン等、界面活性剤等の消泡剤を添加してもよい。上記の培養は上記の栄養源を含有すれば、培地は液体でも固体でもよいが、通常は液体培地を用い、培養するのがよい。少量生産の場合にはフラスコを用いる培養が好適である。培養を大きなタンクで行う場合は、生産工程において、菌の生育遅延を防止するため、はじめに比較的少量の培地に生産菌を接種培養した後、次に培養物を大きなタンクに移して、そこで生産培養するのが好ましい。この場合、前培養に使用する培地および生産培養に使用する培地の組成は、両者ともに同一であってもよいし、必要があれば両者を変えてもよい。

培養を通気攪拌条件で行う場合は、例えばプロペラやその他機械による攪拌、ファメーターの回転または振とう、ポンプ処理、空気の吹き込み等既知の方法が適宜使用される。通気用の空気は滅菌したものを使用する。培養温度は、本F O - 6 9 7 9 物質生産菌が本F O - 6 9 7 9 - M 0 物質、- M 1 物質、- M 2 物質、- M 3 物質及び- M 4 物質を生産する範囲内で適宜変更し得るが、通常は20～30℃、好ましくは27℃前後で培養するのがよい。培養pHは、通常は5～8、好ましくは7前後で培養するのがよい。培養時間は、培養条件によっても異

なるが、通常は10～20日程度である。

このようにして得られたFO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質は培養菌体および培養液に存在する。培養物から目的とするFO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質を採取するには、全培養物をアセトン等の水混和性有機溶媒で抽出し、抽出液を減圧下有機溶媒を留去後、続いて残渣を酢酸エチル等の水不混和性有機溶媒で抽出することによって行われる。上記の抽出法に加え、脂溶性物質の採取に用いられる公知の方法、例えば吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、遠心向流分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を適宜組み合わせ、あるいは繰り返すことにより、FO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質を分離、精製することができる。

次に、本発明のFO-6979類物質の理化学的性状について説明する。

#### 1. FO-6979-M0物質

(1) 性状 : 白色粉末。

(2) 融点 : 244～246℃。

(3) 分子式 :  $C_{22}H_{39}N_3O_5$  FAB-MS ( $m/z$ ) : 426  $[M+H]^+$ 、448  $[M+Na]^+$ 、HRFAB-MS ( $m/z$ ) MF+Na  $C_{22}H_{39}N_3O_5Na$  計算値 : 448.27873、実測値 : 448.2787。

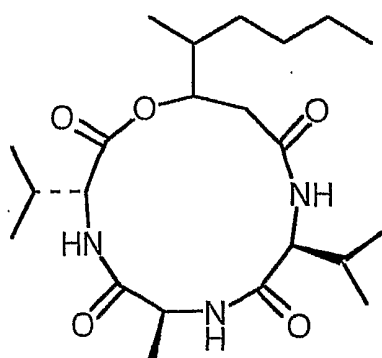
(4) 分子量 : 425 (高速原子衝撃質量分析による)。

(5) 紫外吸収スペクトル :  $\lambda_{max}$  209 nm ( $CH_3OH$ 、 $\log \epsilon = 18216$ ) に極大吸収を有する。

(6) 赤外吸収スペクトル (KBr錠) :  $\nu_{max}$  1535、1639、1683、1724  $cm^{-1}$  に極大吸収を有する。

- (7) 比旋光度： $[\alpha]_D^{23} = -44^\circ$  ( $c = 0.41$ 、クロロホルム：メタノール = 2 : 1)。
- (8) 溶剤に対する溶解性：メタノール、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに可溶。水、ヘキサンに難溶。
- (9) 呈色反応：硫酸、リンモリブデン酸に陽性。
- (10) 酸性、中性、塩基性の区別：中性物質。
- (11)  $^1\text{H}$ -プロトン核磁気共鳴スペクトルの測定 [XL-400 (バリアン社製、日本国)] を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム：重メタノール = 1 : 2] : 第1図に示すとおり。
- (12)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトルの測定にはXL-400 (バリアン社製、日本国) を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム：重メタノール = 2 : 1 を用いて測定した。その測定結果は、13.4、14.6、15.0、18.2、18.4、18.5、18.7、22.5、27.7、29.1、30.1、30.4、35.1、35.4、49.2、60.2、62.1、76.3、169.0、171.4、171.8及び171.9 ppmに2本のシグナル与えた。

以上述べたように、本FO-6979-M0物質の各種理化学的性状やスペクトルデータを検討した結果、本FO-6979-M0物質は次の化学構造であることが決定された。



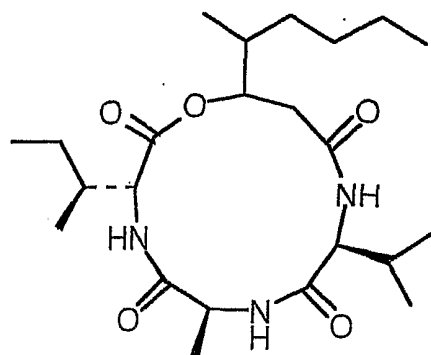
[ I ]

## 2. FO-6979-M1物質

- (1) 性状 : 白色粉末。
- (2) 融点 : 240~242℃。
- (3) 分子式:  $C_{23}H_{41}N_3O_5$  FAB-MS ( $m/z$ ) : 440  $[M+H]^+$ 、462  $[M+Na]^+$  ; HRFAB-MS ( $m/z$ )  $MF+Na$   
 $C_{23}H_{41}N_3O_5Na$  計算値: 462.29438、実測値: 462.2944。
- (4) 分子量: 439 (高速原子衝撃質量分析による)。
- (5) 紫外吸収スペクトル:  $\lambda_{max}$  208 nm ( $CH_3OH$ ,  $\log \epsilon = 24100$ ) に極大吸収を有する。
- (6) 赤外部吸収スペクトル (KBr錠) :  $\nu_{max}$  1537、1639、1681、1724  $cm^{-1}$  に極大吸収を有する。
- (7) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{23} = -37^\circ$  ( $c = 0.5$ 、クロロホルム: メタノール = 2:1)。
- (8) 溶剤に対する溶解性: メタノール、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに可溶。水、ヘキサンに難溶。
- (9) 呈色反応: 硫酸、リンモリブデン酸に陽性。
- (10) 酸性、中性、塩基性の区別: 中性物質。
- (11)  $^1H$ -プロトン核磁気共鳴スペクトルの測定 [XL-400 (バリアン社製、日本国) を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム: 重メタノール = 1:2]: 第2図に示すとおり。
- (12)  $^{13}C$ -核磁気共鳴スペクトルの測定には XL-400 (バリアン社製、日本国) を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム: 重メタノール = 1:2 を用いて測定した。その測定結果は、10.5、13.6、14.3、14.7、15.1、18.7、18.9、23.0、25.9、28.2、29.6、29.8、30.5、35.7、35.8、37.0、49.6、59.5、76.8、169.6、172.1、172

3及び172.6 ppmに23本のシグナルを与えた。

以上述べたように、本FO-6979-M1物質の各種理化学的性状やスペクトルデータを検討した結果、本FO-6979-M1物質は次の化学構造であることが決定された。



[II]

### 3. FO-6979-M2物質

(1) 性状 : 白色粉末。

(2) 融点 : 243~246℃。

(3) 分子式:  $C_{23}H_{41}N_3O_5$  FAB-MS ( $m/z$ ) : 440  $[M+H]^+$ 、462  $[M+Na]^+$  ; HRFAB-MS ( $m/z$ )  $MF+H$   
 $C_{23}H_{42}N_3O_5$  計算値: 440.31242、実測値: 440.3124。

(4) 分子量: 439 (高速原子衝撃質量分析による)。

(5) 紫外部吸収スペクトル:  $\lambda_{max}$  209 nm ( $CH_3OH$ 、 $\log \epsilon = 15027$ ) に極大吸収を有する。

(6) 赤外部吸収スペクトル (KBr錠) :  $\nu_{max}$  1537、1639、1681、1724  $cm^{-1}$  に極大吸収を有する。

(7) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = -65^\circ$  ( $c = 0.47$ 、クロロホルム: メタノール = 2:1)。

(8) 溶剤に対する溶解性: メタノール、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチ

ルに可溶。水、ヘキサンに難溶。

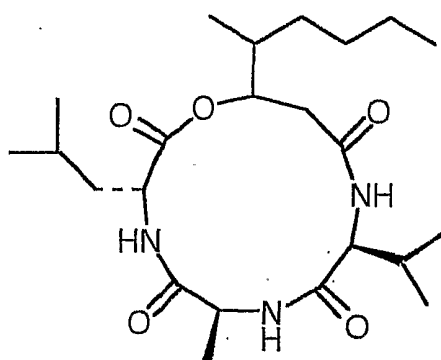
(9) 呈色反応：硫酸、リンモリブデン酸に陽性。

(10) 酸性、中性、塩基性の区別：中性物質。

(11)  $^1\text{H}$ -プロトン核磁気共鳴スペクトル [XL-400 (バリアン社製、日本国) を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム：重メタノール=1：2] 第3図に示すとおり。

(12)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトルの測定にはXL-400 (バリアン社製、日本国) を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム：重メタノール=1：2を用いた。その測定結果は、14.3、15.6、15.9、19.4、19.6、22.6、22.6、23.7、25.7、29.0、30.3、30.4、31.5、36.4、36.6、41.9、50.2、53.5、77.3、170.7、172.6、173.2及び173.2 ppmに2本のシグナルを与えた。

以上述べたように、本FO-6979-M2物質の各種理化学的性状やスペクトルデータを検討した結果、本FO-6979-M2物質は次の化学構造であることが決定された。



[Ⅲ]

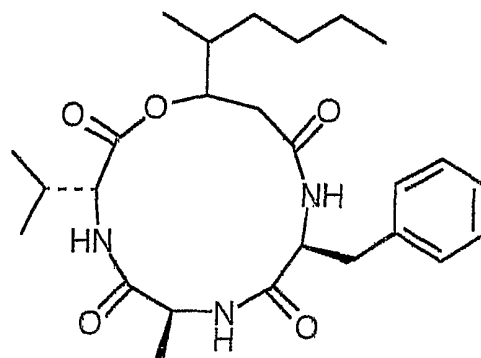
#### 4. FO-6979-M3物質

(1) 性状：白色粉末。

(2) 融点：249～251℃。

- (3) 分子式:  $C_{26}H_{39}N_3O_5$  FAB-MS ( $m/z$ ): 474  $[M+H]^+$ 、496  $[M+Na]^+$ ; HRFAB-MS ( $m/z$ )  $MF+H$   
 $C_{26}H_{40}N_3O_5$  計算値: 474.29677、実測値: 474.2968。
- (4) 分子量: 473 (高速原子衝撃質量分析による)。
- (5) 紫外吸収スペクトル:  $\lambda_{max}$  209 nm ( $CH_3OH$ ,  $\log \epsilon = 28044$ ) に極大吸収を有する。
- (6) 赤外部吸収スペクトル (KBr錠):  $\nu_{max}$  1537、1639、1687、1726  $cm^{-1}$  に極大吸収を有する。
- (7) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{23} = -9.0^\circ$  ( $c = 0.20$ 、クロロホルム: メタノール = 2:1)。
- (8) 溶剤に対する溶解性: メタノール、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに可溶。水、ヘキサンに難溶。
- (9) 呈色反応: 硫酸、リンモリブデン酸に陽性。
- (10) 酸性、中性、塩基性の区別: 中性物質。
- (11)  $^1H$ -プロトン核磁気共鳴スペクトルの測定には [XL-400 (バリアン社製、日本国)] を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム: 重メタノール = 4:1] : 第4図に示すとおり
- (12)  $^{13}C$ -核磁気共鳴スペクトルの測定には XL-600 (バリアン社製、日本国) を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム: 重メタノール = 4:1 を用いて測定した。その測定結果は、13.6、14.6、15.2、18.4、18.6、22.6、29.2、30.3、30.6、35.3、35.4、35.7、49.2、56.8、60.3、76.3、126.7、128.3 (2炭素分)、128.8 (2炭素分)、136.2、169.1、171.3、171.9 及び 183.5 ppm に24本 (26炭素分) のシグナルを与えた。
- 以上述べたように、本FO-6979-M3物質の各種理化学的性状やスペク

トルデータを検討した結果、本FO-6979-M3物質は次の化学構造であることが決定された。



[IV]

#### 5. FO-6979-M4物質

(1) 性状 : 白色粉末

(2) 融点 : 244~246℃

(3) 分子式:  $C_{25}H_{45}N_3O_5$  FAB-MS ( $m/z$ ) : 468  $[M+H]^+$ 、490  $[M+Na]^+$  ; HRFAB-MS ( $m/z$ )  $MF+H$   
 $C_{25}H_{46}N_3O_5$  計算値: 468.34372、実測値: 468.3437

(4) 分子量: 467 (高速原子衝撃質量分析による)

(5) 紫外部吸収スペクトル:  $\lambda_{max}$  207 nm ( $CH_3OH$ ,  $\log \epsilon = 2.1400$ ) に極大吸収を有する

(6) 赤外部吸収スペクトル (KBr錠) :  $\nu_{max}$  1537、1639、1685、1722  $cm^{-1}$  に極大吸収を有する

(7) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{28} = -45^\circ$  ( $c = 0.30$ 、クロロホルム: メタノール = 2:1)

(8) 溶剤に対する溶解性: メタノール、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチルに可溶。水、ヘキサンに難溶

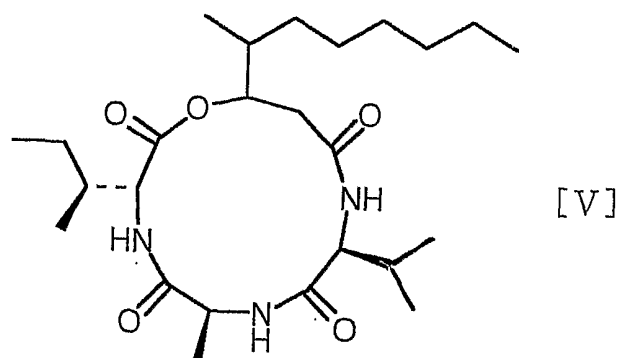
(9) 呈色反応: 硫酸、リンモリブデン酸に陽性

(10) 酸性、中性、塩基性の区別：中性物質

(11)  $^1\text{H}$ -プロトン核磁気共鳴スペクトルの測定 [XL-400 (バリアン社製、日本国) を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム：重メタノール = 1 : 2] : 第5図に示すとおり

(12)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトルの測定にはXL-400 (バリアン社製、日本国) を用いて測定し、溶媒は重クロロホルム：重メタノール = 1 : 2 を用いて測定した。その測定結果は、11.3、14.3、15.1、15.5、15.9、19.4、19.6、23.3、26.7、28.2、28.9、30.4、31.6、32.6、36.5、36.6、37.8、50.4、60.4、62.8、77.6、170.3、170.3、173.1及び173.4 ppmに25本のシグナルを与えた。

以上述べたように、本FO-6979-M4物質の各種理化学的性状やスペクトルデータを検討した結果、本FO-6979-M4物質は次の化学構造であることが決定された。



次に、本発明のFO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質（以下FO-6979類物質と総称する）のマウス由来アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対する阻害作用について説明する。

アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素活性は、U e l m e n らの方法 (J. B i o l. C h e m. 270 巻、26192～26201 頁、1995 年) を一部改変して行った。酵素源としては、マウス肝ミクロソーム由来の膜画分を用いた。マウス肝は緩衝液A [50 mM トリス塩酸液 (pH 7.8)、1 mM E D T A 及び 1 mM フェニルメタンスルフォニルフルオリド] 中でポッター型ホモジナイザー (T o k y o - R I K O 社製) でホモジナイズする。

これを  $12000 \times g$  で遠心した上清を  $100000 \times g$  で超遠心した沈渣をミクロソーム画分とし、この画分を  $5 \text{ mg/ml}$  の蛋白質濃度となるように緩衝液Aで調製した。アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素活性の測定は、緩衝液A中で酵素源  $200 \mu\text{g}$  蛋白量、 $200 \text{ mM}$  牛血清アルブミン、[ $1-^{14}\text{C}$ ] オレオイルコエンザイムA (最終濃度  $170 \mu\text{M}$ 、 $0.09 \mu\text{Ci}$ ) と各々のFO-6979類物質を加え全量  $100 \mu\text{l}$  として、 $37^\circ\text{C}$ 、10 分間、反応させた。

次いでそこに、 $0.5 \text{ ml}$  エタノールを加えて反応を停止させ、 $1.5 \text{ ml}$  ヘキサンを加えてよく攪拌した。ヘキサン層  $1 \text{ ml}$  を乾固後、TLC (シリカゲルプレート、厚さ  $0.5 \text{ mm}$ 、メルク社製、米国) にスポットし、石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸 ( $90:10:1$ 、 $v/v$ ) の溶媒で展開した。次に生成した [ $^{14}\text{C}$ ] コレステリルオレートの量をラジオスキャナー (アンビス社製) で定量した。その結果は、FO-6979類物質 (M0 物質～M4 物質) のアシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素活性を  $50\%$  阻害する濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は以下のとおり測定された。

| 化合物           | $\text{IC}_{50} (\mu\text{M})$ |
|---------------|--------------------------------|
| FO-6979-M0 物質 | $> 50$                         |
| FO-6979-M1 物質 | $> 50$                         |
| FO-6979-M2 物質 | $50$                           |

|              |    |
|--------------|----|
| FO-6979-M3物質 | 40 |
| FO-6979-M4物質 | 50 |

---

次に、本発明のFO-6979類物質のマウス腹腔マクロファージ内でのコレステリルエステル生成に対する阻害作用について説明する。

マウス腹腔マクロファージ内でのコレステリルエステル形成および油滴形成は生田目らの方法(J. Biochem. 125巻、319～327頁、1999年)に従い行った。マウス腹腔より単離したマクロファージを6.8%リポ蛋白質欠乏血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(6.8%LPDS-DMEM培地)に $2.0 \times 10^6$  cells/mlで懸濁して、48穴マイクロプレート(Corning社製)に0.25mlずつまいた。

次に5%炭酸ガスインキュベーター内で37℃で2時間培養を行った後、付着しない細胞をハanks液(Hanks' solution)で洗浄することにより除去する。洗浄後、6.8%LPDS-DMEM培地で一時間培養した後、各々のFO-6979類物質(2.5μlメタノール溶液)、リポソーム[10μlの0.3Mグルコース中にホスファチジルコリン/ホスファチジルセリン/ジセチルホスフェート/コレステロール=10:10:2:15(nmol)の組成から構成されている]及び[1-<sup>14</sup>C]オレイン酸(5μl、0.05μCi、1nmol)を添加し、さらに14時間培養した。

培養後上清を除去し、細胞内中性脂質をヘキサン0.6mlとイソプロパノール0.4mlを加えて2回抽出した。これを濃縮後、TLC(シリカゲルプレート、メルク社製、厚さ0.5mm)にスポットし、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸(70:30:1、v/v)の溶媒で展開し、分離した[<sup>14</sup>C]コレステリルオレートと[<sup>14</sup>C]トリアシルグリセロールの量をラジオスキャナー(アンビス社製)で定量した。その結果は、[<sup>14</sup>C]コレステリルオレートの生成を選択的に阻害し、そのIC<sub>50</sub>値は下記のとおり測定された。

| 化合物          | IC <sub>50</sub> (μM) |
|--------------|-----------------------|
| FO-6979-M0物質 | > 25                  |
| FO-6979-M1物質 | > 45                  |
|              | (45 μMで20%阻害)         |
| FO-6979-M2物質 | > 25                  |
| FO-6979-M3物質 | 21                    |
| FO-6979-M4物質 | > 25                  |

次に、本発明のFO-6979類物質のマウス腹腔マクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用について説明する。

マウス腹腔マクロファージ内での油滴形成は生田目らの方法(J. Biochem. 125巻、319～327頁、1999年)に従って行った。マウス腹腔より単離したマクロファージを6.8%リボ蛋白質欠乏血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(6.8%LPDS-DMEM培地)に $2.0 \times 10^6$  cells/mlで懸濁して、スライドチャンバー(Nunc社製)に0.25mlずつまいた。

次に5%炭酸ガスインキュベーター内で37℃で2時間培養を行った後、付着しない細胞をハanks液(Hanks' solution)で洗浄することにより除去する。洗浄後、6.8%LPDS-DMEM培地で1時間培養した後、FO-6979-M3物質(2.5 μlメタノール溶液)、リポソーム[10 μlの0.3Mグルコース中にホスファチジルコリン/ホスファチジルセリン/ジセチルホスフェート/コレステロール=10:10:2:15(nmol)の組成から構成されている]を添加し、さらに14時間培養した。

その後、マクロファージ内の油滴及び核をそれぞれオイルレッドO(oil r

e d O) 及びヘマトキシリンで二重染色し、光学顕微鏡（オリンパス光学社製、日本国）で観察した。その結果、FO-6979-M3物質20  $\mu$ M存在下で、細胞質に蓄積する油滴の量は薬剤無添加（コントロール）と比較すると約50%に減少し、FO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質及び-M4物質では40  $\mu$ M存在下で油滴の量は10～20%の減少が認められた。

次に本発明のFO-6979類物質の毒性試験について説明する。

前記FO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質のいずれも、マウス腹腔マクロファージの生育に対して最終濃度50  $\mu$ Mでも全く毒性を示さなかった。FO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質のいずれも100 mg/kgでマウス腹腔内に投与したが、何ら毒性変化は認められなかった。

以上述べたように、本発明のFO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質は毒性が低く、アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対して特異的な阻害を示し、マクロファージ内での油滴形成を阻害することから、ヒトのコレステロール蓄積に起因する疾病の予防治療に有用であると期待される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は本発明のFO-6979-M0物質の<sup>1</sup>H-プロトン核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム：重メタノール＝1：2）である。

第2図は本発明のFO-6979-M1物質の<sup>1</sup>H-プロトン核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム：重メタノール＝1：2）である。

第3図は本発明のFO-6979-M2物質の<sup>1</sup>H-プロトン核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム：重メタノール＝1：2）である。

第4図は本発明のFO-6979-M3物質の<sup>1</sup>H-プロトン核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム：重メタノール＝1：2）である。

トル（重クロロホルム：重メタノール＝１：２）である。

第５図は本発明のFO-6979-M4物質の<sup>1</sup>H-プロトン核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム：重メタノール＝１：２）である。

#### 発明を実施するための最良の形態

500ml容三角フラスコにグルコース2.0%、ポリペプトン0.5%、イーストエキストラクト0.2%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%、アガー0.1%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.05%を水道水で溶解した培地（pH6.0に調整）100mlを仕込み、綿栓後、蒸気滅菌し、寒天培地上に生育させたボーベリアエスピー（*Beauveria* sp.）FO-6979（FERM BP-6681）の孢子懸濁液（10<sup>7</sup> spores/ml）を100μlを無菌的に植菌し、27℃で3日間振とう培養して種培養液を得た。

一方、30リットル容ジャー培養装置（三ツワ社製、日本国）にグルコース1.0%、トリプトン0.5%、イーストエキストラクト0.3%、アガー0.1%を水道水で溶解した培地（pH6.0に調整）を20リットルに仕込み、蒸気滅菌し、上記の種培養液200mlを無菌的に移植した。これを27℃で5日間攪拌培養後、培養液20リットルを国産式S型超遠心分離機S-6型（国産精工社製、日本国）を用いて、10000回転で上清と菌体に分離し、菌体を18リットルのアセトンで処理してろ過した後、ろ液を減圧濃縮して水溶液および析出物を得た。この析出物を200mlヘキサンの洗浄し、不溶の粗物質6gを得た。これをシリカゲル（600g、シリカゲル60、メルク社製、米国）のカラムにチャージし、クロロホルム-メタノール（100：0、100：1、100：2、100：3、0：100）の溶液各3.6リットルで段階的に溶出させた。

溶出されたFO-6979-M1成分、-M2成分及び-M4成分を含むクロロホルム-メタノール（100：2）画分を集め、減圧乾固して白色物質168mgを得た。これをさらに高速液体クロマトグラフィー〔装置はRANIN社製のモデルSD-200、カラムは資生堂社製のCAPCELL-PAC C18

UG (20×250 mm)、検出はUV 210 nm、流速は6 ml/分、溶出条件は50分まで50%のアセトニトリル水で溶出し、その後、25分間に75%アセトニトリル水になるよう直線的に濃度を変化させた]で繰り返し精製することにより、溶出時間45分のピークから本発明のFO-6979-M1物質47.6 mg、溶出時間49分のピークからFO-6979-M2物質44.5 mg、溶出時間77分のピークからFO-6979-M4物質27.2 mgをそれぞれ得た。

一方、30リットル容ジャー培養装置(三ツワ社製、日本国)にグルコース1.0%、トリプトン0.5%、イーストエキストラクト0.3%、モルトエキストラクト0.3%、アガー0.1%を水道水で溶解した培地(pH 6.0に調整)を20リットル仕込み、蒸気滅菌し、前記の種培養液200 mlを無菌的に移植し、27℃で攪拌培養を開始した。24時間後、この培養液にろ過滅菌したL-バリン水溶液を最終濃度0.3%で無菌的に添加した。これをさらに27℃で4日間攪拌培養して得られた培養液20リットルを、同様に遠心により集めた菌体をアセトン処理し、ろ過して得られたろ液を減圧濃縮して析出物を得た。これを200 mlヘキサンの洗浄し、得られた不溶の粗物質1.8 gをシリカゲル(180 g、シリカゲル60、メルク社製、米国)のカラムにチャージし、クロロホルム-メタノール(100:0、100:1、100:2、100:3、0:100)の溶液各1.1リットルで段階的に溶出させた。

溶出されたFO-6979-M3成分を多く含む画分(クロロホルム-メタノール100:2溶出液の前半部分)とFO-6979-M0成分を多く含む画分(クロロホルム-メタノール100:2溶出液の後半部分)とを集め、減圧乾固して、それぞれ白色物質100 mgと357 mgを得た。これをさらに個々に高速液体クロマトグラフィー(装置はRANIN社製のモデルSD-200、カラムは資生堂社製のCAPCELL-PAC C18 UG (20×250 mm)、検出はUV 210 nm、流速は6 ml/分、溶出条件は50分まで50%のア

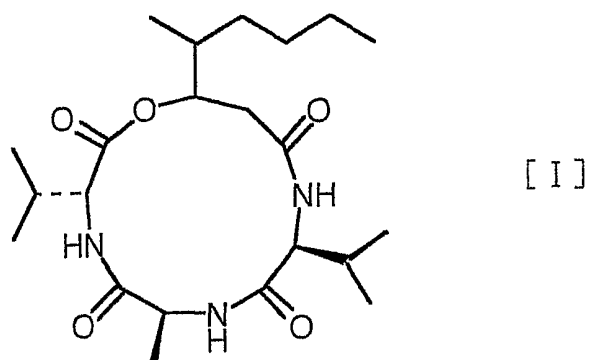
セトニトリル水で溶出し、その後、25分間に75%アセトニトリル水になるよう直線的に濃度を変化させた)で繰り返し精製することにより、溶出時間27分のピークから本発明のFO-6979-M0物質182mg、溶出時間52分のピークからFO-6979-M3物質10.5mgをそれぞれ得た。

#### 産業上の利用分野

以上説明したように、本発明のFO-6979-M0物質、-M1物質、-M2物質、-M3物質及び-M4物質は、毒性が低く、アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対して特異的な阻害を示し、またコレステリルエステルに対する阻害作用及びマクロファージ内での油滴形成を阻害することから、ヒトのコレステロール蓄積に起因する疾病の予防および治療に有用であると期待される。

## 請 求 の 範 囲

## 1. 下記式 [I]



で表される化合物であるFO-6979-M0物質。

2. ボーベリア属に属し、FO-6979-M0物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M0物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M0物質を採取することを特徴とする新規FO-6979-M0物質の製造法。

3. ボーベリア属に属し、FO-6979-M0物質を生産する能力を有する微生物が、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) である請求の範囲2記載の製造法。

4. ボーベリア属に属し、FO-6979-M0物質を生産する能力を有する微生物。

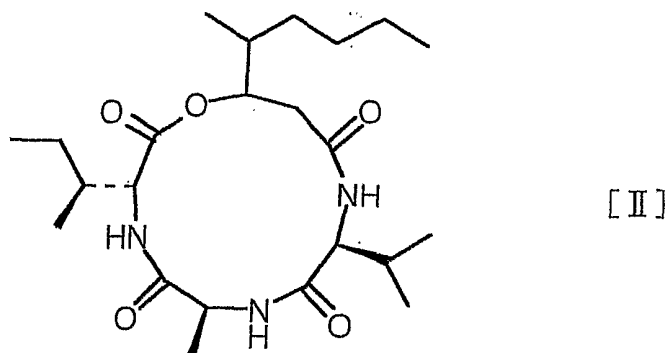
5. ボーベリア属に属し、FO-6979-M0物質を生産する能力を有するボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681)である請求の範囲4記載の微生物。

6. アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有する請求の範囲1記載のFO-6979-M0物質。

7. コレステリルエステル生成に対する阻害作用を有する請求の範囲1記載のFO-6979-M0物質。

8. マクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有する請求の範囲1記載のFO-6979-M0物質。

9. 下記式〔II〕



で表される化合物であるFO-6979-M1物質。

10. ボーベリア属に属し、FO-6979-M1物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M1物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M1物質を採取することを特徴とする新規FO-6979-M1物質の製造法。

11. ボーベリア属に属し、FO-6979-M1物質を生産する能力を有する微生物が、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681)である請求の範囲11記載の製造法。

12. ボーベリア属に属し、FO-6979-M1物質を生産する能力を有する微生物。

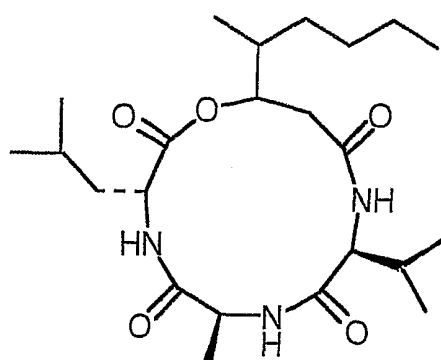
13. ボーベリア属に属し、FO-6979-M1物質を生産する能力を有するボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681)である請求の範囲13記載の微生物。

14. アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有する請求の範囲9記載のFO-6779-M1物質。

15. コレステリルエステル生成に対する阻害作用を有する請求の範囲9記載のFO-6779-M1物質。

16. マクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有する請求の範囲9記載のFO-6779-M1物質。

17. 下記式 [Ⅲ]



[III]

で表される化合物であるFO-6979-M2物質。

18. ボーベリア属に属し、FO-6979-M2物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M2物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M2物質を採取することを特徴とする新規FO-6979-M2物質の製造法。

19. ボーベリア属に属し、FO-6979-M2物質を生産する能力を有する微生物が、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) である請求の範囲18記載の製造法。

20. ボーベリア属に属し、FO-6979-M2物質を生産する能力を有する微生物。

21. ボーベリア属に属し、FO-6979-M2物質を生産する能力を有するボーベリア エスピー (*Beauveria* sp.) FO-6979 FERM BP-6681) である請求の範囲20記載の微生物。

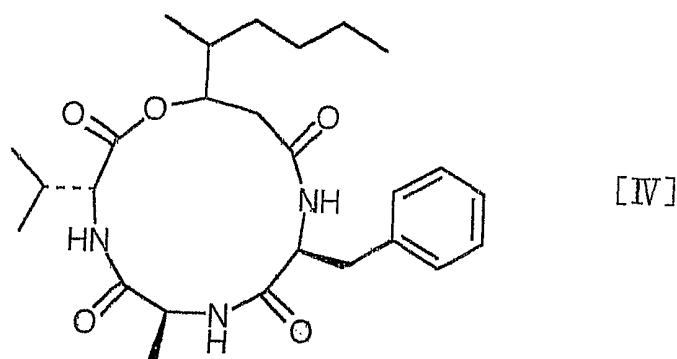
22. アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対して阻害作

用を有する請求の範囲 17 記載の FO-6779-M2 物質。

23. コレステルルエステル生成に対する阻害作用を有する請求の範囲 17 記載の FO-6779-M2 物質。

24. マクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有する請求の範囲 17 記載の FO-6779-M2 物質。

25. 下記式 [IV]



で表される化合物である FO-6779-M3 物質。

26. ボーベリア属に属し、FO-6979-M3 物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中に FO-6979-M3 物質を蓄積せしめ、該培養物から FO-6979-M3 物質を採取することを特徴とする新規 FO-6979-M3 物質の製造法。

27. ボーベリア属に属し、FO-6979-M3 物質を生産する能力を有する微生物が、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) である請求の範囲 26 記載の製造法。

28. ボーベリア属に属し、FO-6979-M3物質を生産する能力を有する微生物。

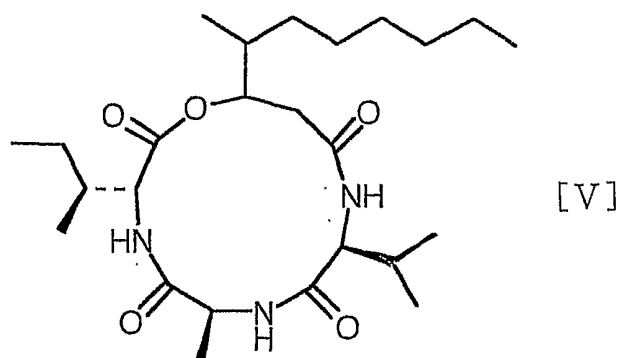
29. ボーベリア属に属し、FO-6979-M3物質を生産する能力を有するボーベリア エスピー (*Beauveria* sp.) FO-6979 (FERM BP-6681) である請求の範囲28記載の微生物。

30. アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有する請求の範囲25記載のFO-6979-M3物質。

31. コレステリルエステル生成に対する阻害作用を有する請求の範囲25記載のFO-6979-M3物質。

32. マクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有する請求の範囲25記載のFO-6979-M3物質。

33. 下記式 [V]



で表される化合物であるFO-6979-M4物質。

34. ボーベリア属に属し、FO-6979-M4物質を生産する能力を有

する微生物を培地に培養し、培養液中にFO-6979-M4物質を蓄積せしめ、該培養物からFO-6979-M4物質を採取することを特徴とする新規FO-6979-M4物質の製造法。

35. ボーベリア属に属し、FO-6979-M4物質を生産する能力を有する微生物が、ボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) である請求の範囲34記載の製造法。

36. ボーベリア属に属し、FO-6979-M4物質を生産する能力を有する微生物。

37. ボーベリア属に属し、FO-6979-M4物質を生産する能力を有するボーベリア エスピー FO-6979 (*Beauveria* sp. FO-6979 FERM BP-6681) である請求の範囲36記載の微生物。

38. アシルコエンザイムAコレステロールアシル転移酵素に対して阻害作用を有する請求の範囲33記載のFO-6979-M4物質。

39. コレステリルエステル生成に対する阻害作用を有する請求の範囲33記載のFO-6979-M4物質。

40. マクロファージ内での油滴形成に対する阻害作用を有する請求の範囲33記載のFO-6979-M4物質。

FIG. 1

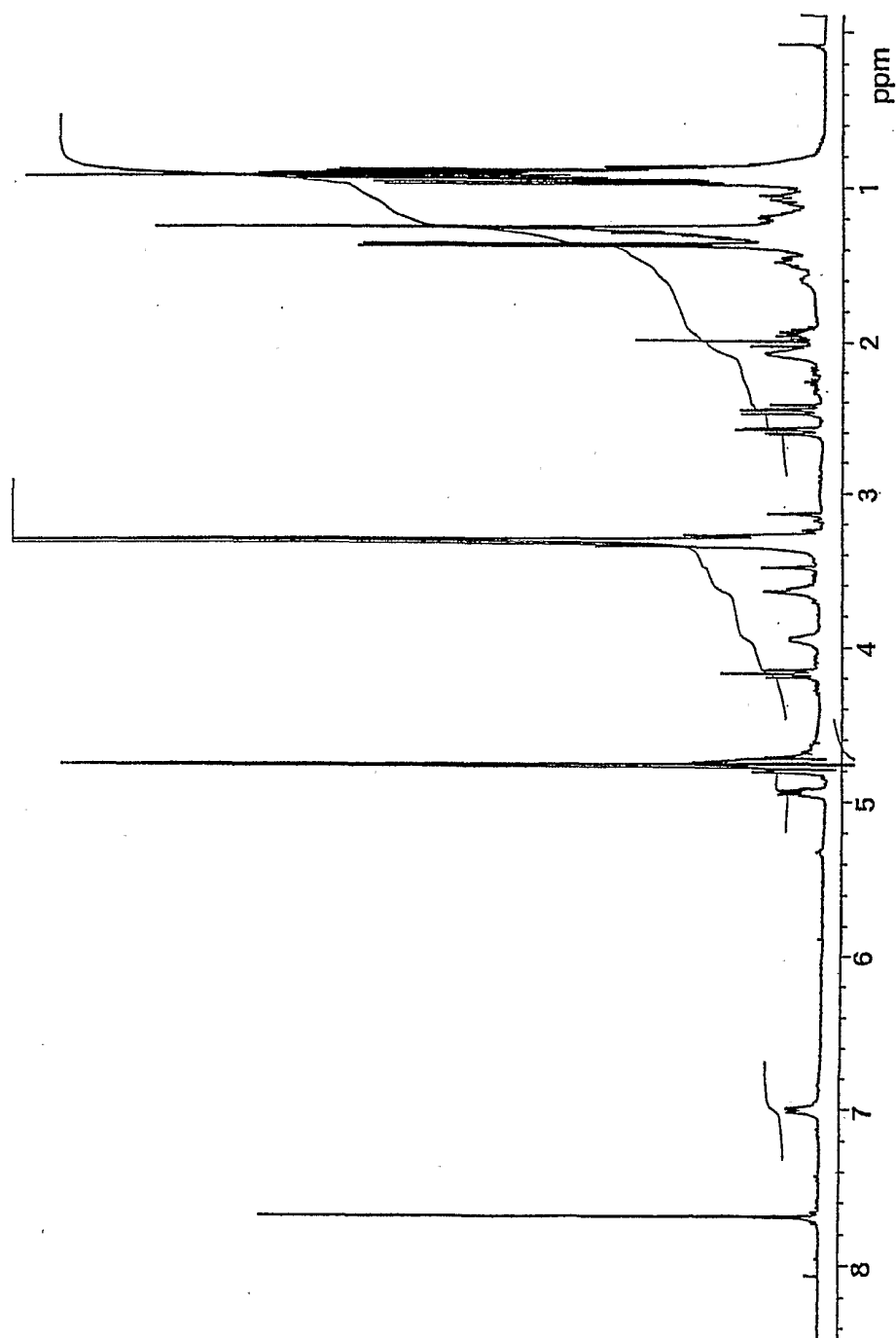


FIG. 2

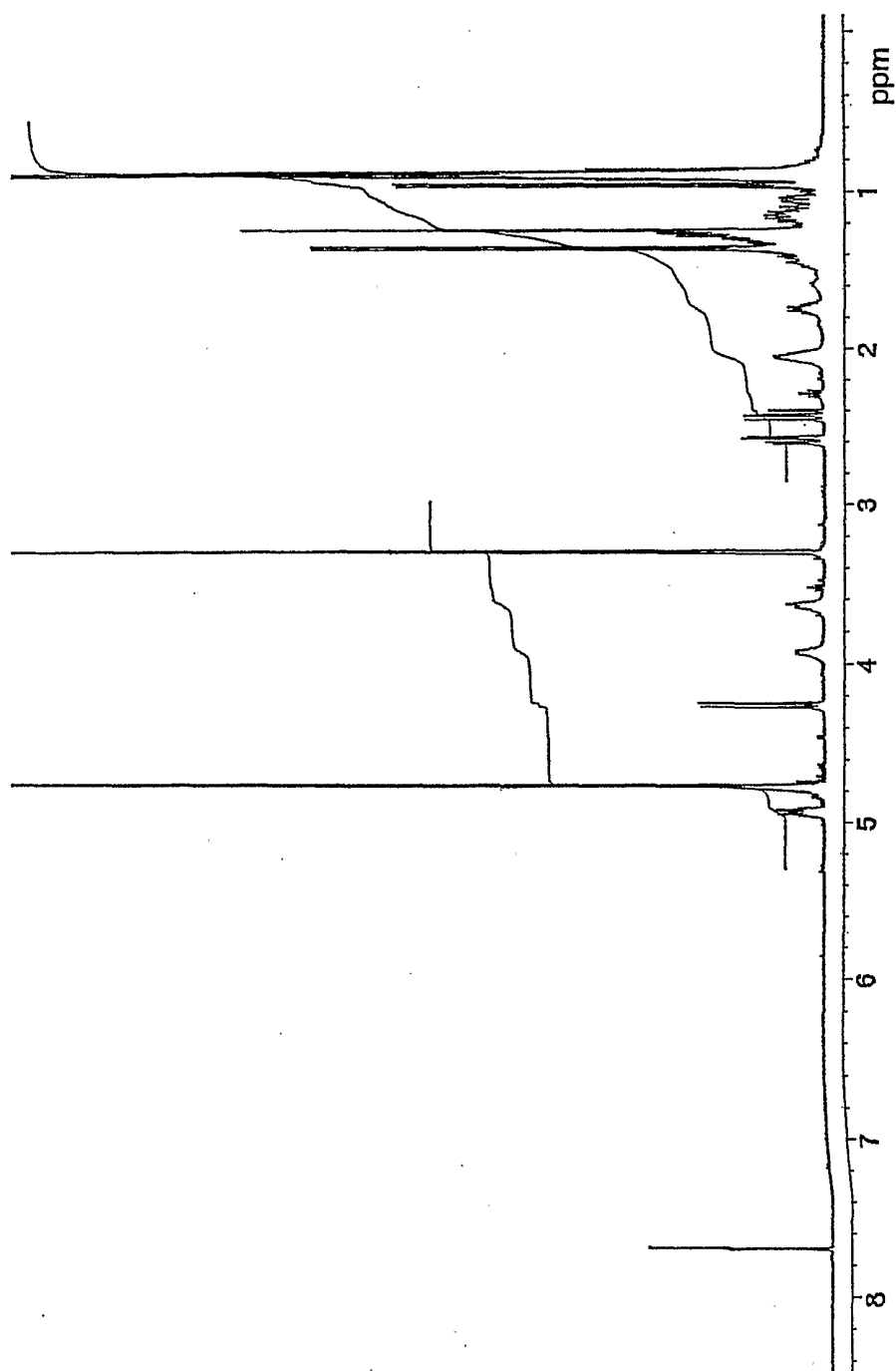


FIG. 3

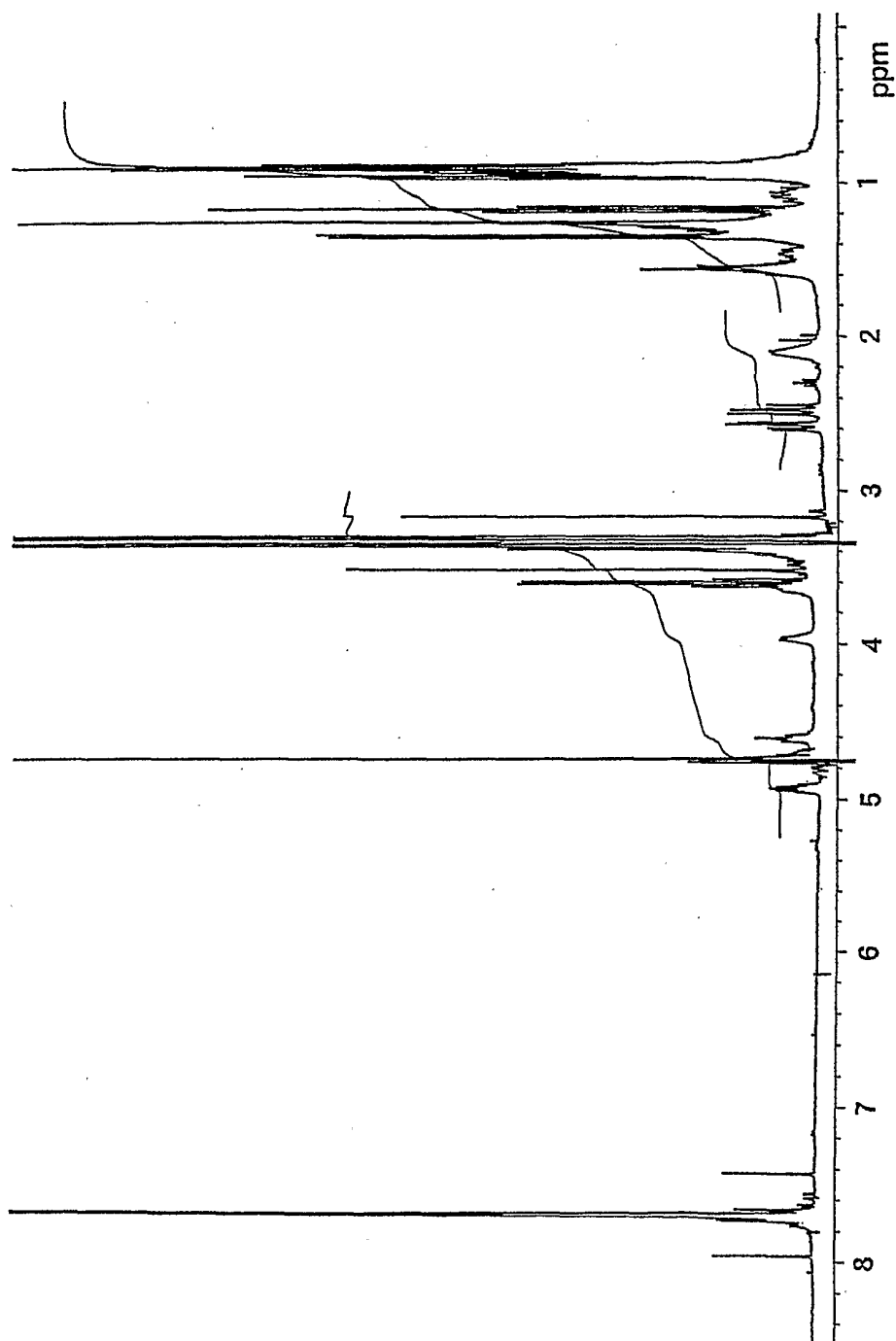


FIG. 4

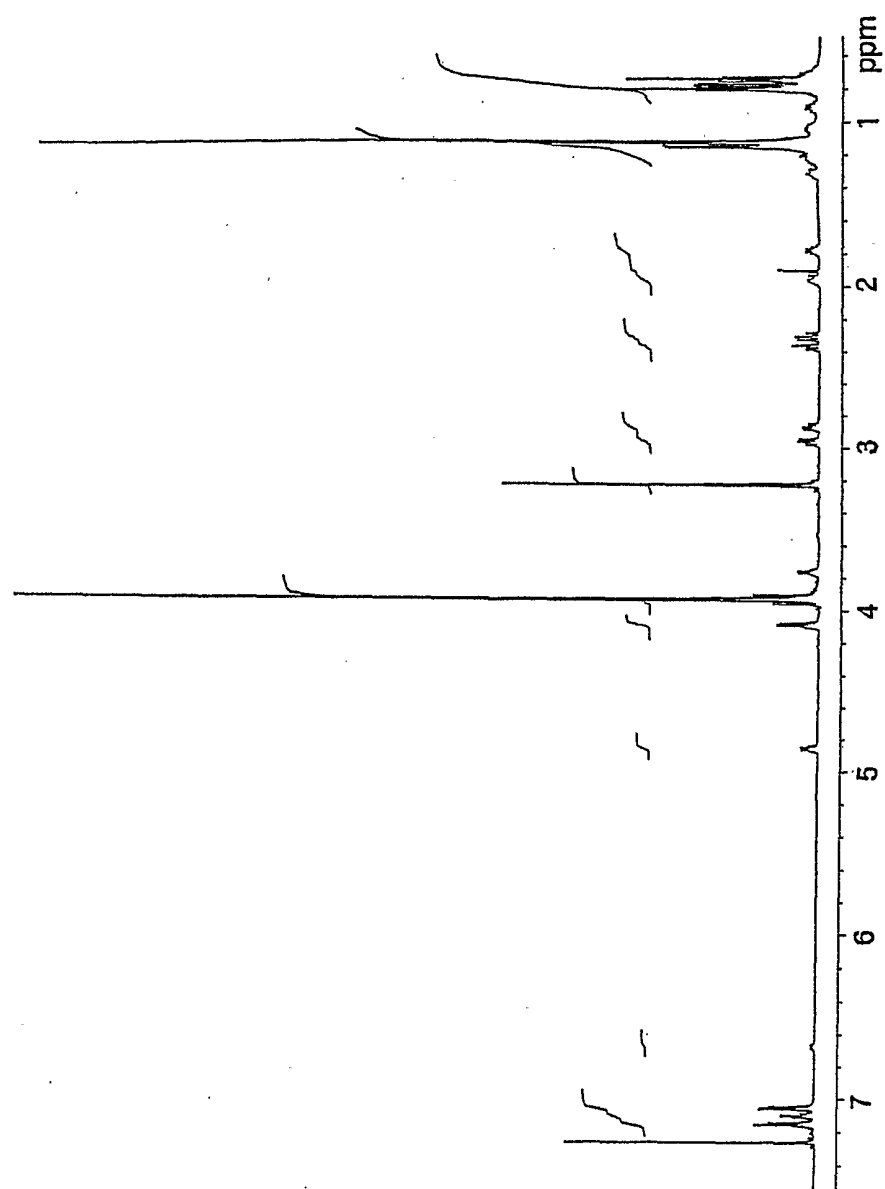
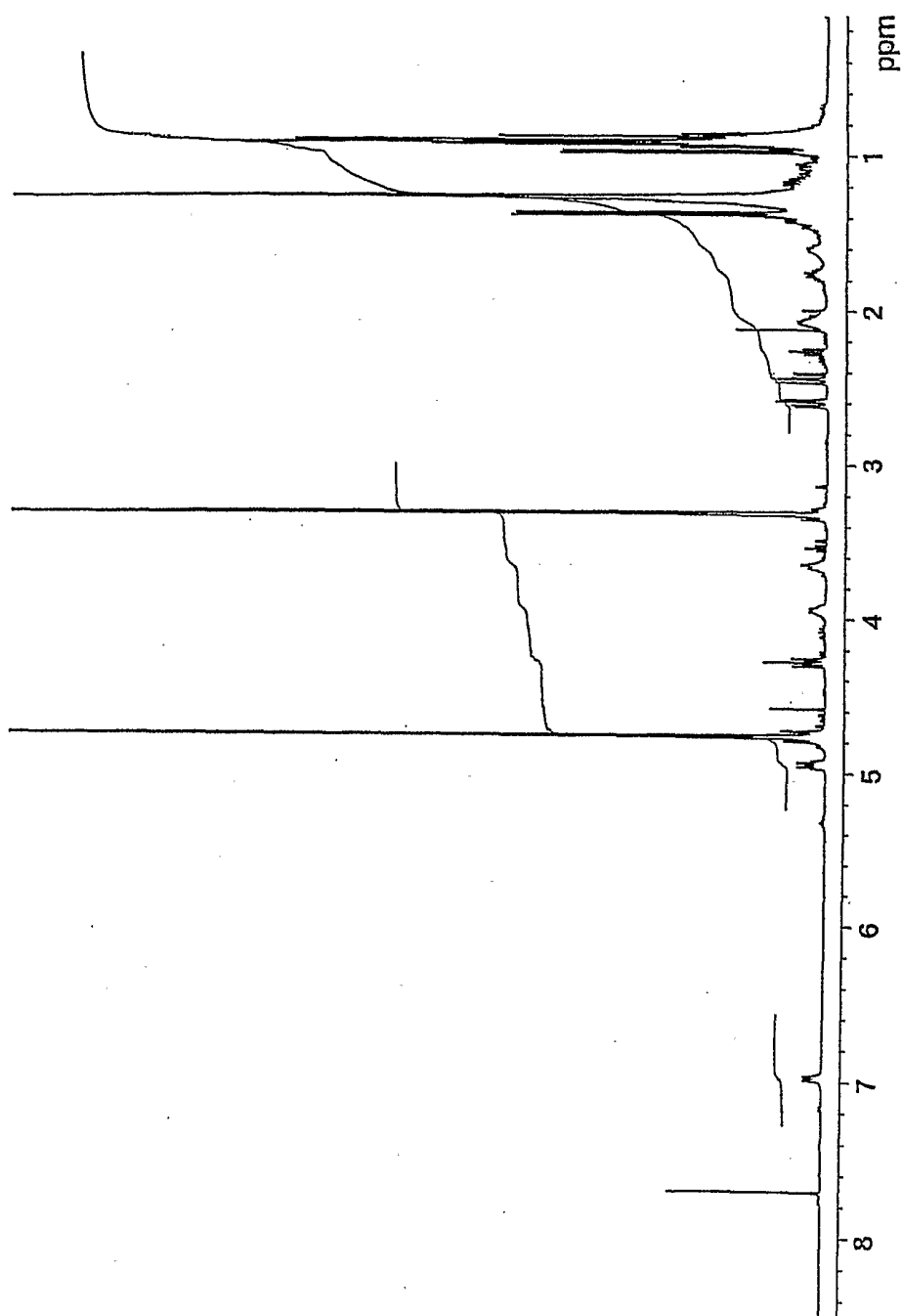


FIG. 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02590

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>Int.Cl <sup>7</sup> C07K5/083, 5/087, C12P21/02, C12N1/14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>Int.Cl <sup>7</sup> C07K5/083, 5/087, C12P21/02, C12N1/14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>REGISTRY/CA (STN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                   |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                | Relevant to claim No.                                                             |
| P, X<br>P, A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | MAREK K et al., Sequencing of new beauverolides by highperformance liquid chromatography and mass spectrometry. J.Mass.Spectrom., Sep. 2001, 36, pages 1108 to 1115                               | 17-24<br>1-16, 25-40                                                              |
| Y<br>A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | MOCHIZUKI K et al., The structures of bioactive cyclodepsipeptides, Beauveriolides I and II, metabolites of entomopathogenic Fungi Beauveria sp. Bull.Chem.Soc.Jpn., 1993, 66, pages 3041 to 3046 | 1, 6-9,<br>14-17, 22-25,<br>30-33, 38-40<br>2-5, 10-13,<br>18-21, 26-29,<br>34-37 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"I" 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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                   |
| Date of the actual completion of the international search<br>04 June, 2002 (04.06.02)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | Date of mailing of the international search report<br>25 June, 2002 (25.06.02)    |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                   | Authorized officer                                                                |
| Facsimile No.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                   | Telephone No.                                                                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02590

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                         | Relevant to claim No.                      |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| X         | JP 11-279195 A (Gakko Hojin Kitazato Gakuin),<br>12 October, 1999 (12.10.99),<br>(Family: none)                                                                                                            | 4, 5, 12, 13,<br>20, 21, 28, 29,<br>36, 37 |
| Y         |                                                                                                                                                                                                            | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A         |                                                                                                                                                                                                            | 2, 3, 10, 11,<br>18, 19, 26, 27,<br>34, 35 |
| X         | NAMATAME I et al., Beauveriolides, specific<br>inhibitors of lipid droplet formation in mouse<br>macrophages, produced by Beauveria sp.F0-6979<br>The Journal of Antibiotics, 1999, 52(1), pages 1 to<br>6 | 4, 5, 12, 13,<br>20, 21, 28, 29,<br>36, 37 |
| Y         |                                                                                                                                                                                                            | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A         |                                                                                                                                                                                                            | 2, 3, 10, 11,<br>18, 19, 26, 27,<br>34, 35 |
| Y         | ALEXANDR J et al., Beauverolides L and La from<br>beauveria tenella and paecilomyces fumosoroseus.<br>Phytochemistry, 1994, 37(5), pages 1301 to 1303                                                      | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A         |                                                                                                                                                                                                            | 2-5, 10-13,<br>18-21, 26-29,<br>34-37      |
| Y         | ELSWORTH J F et al., Cyclodepsipeptides from<br>Beauveria bassiana. Part 2. Beauverolides A to F and<br>their relationship to Isarolide. J.Chem.Soc.Perkin<br>Trans. I, 1980, pages 1795 to 1799           | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A         |                                                                                                                                                                                                            | 2-5, 10-13,<br>18-21, 26-29,<br>34-37      |
| Y         | GROVE J F et al., Cyclodepsipeptides from Beauveria<br>bassiana. Part 3. The isolation of Beauverolides<br>Ba, Ca, Ja and Ka. J.Chem.Soc.Perkin Trans. I, 1980,<br>12, pages 2878 to 2880                  | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A         |                                                                                                                                                                                                            | 2-5, 10-13,<br>18-21, 26-29,<br>34-37      |
| Y         | ELSWORTH J F et al., Cyclodepsipeptides from<br>Beauveria bassiana Bals. Part 1. Beauverolides H and<br>I. J.Chem.Soc.Perkin Trans. I, 1977, 3, pages 270<br>to 273                                        | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A         |                                                                                                                                                                                                            | 2-5, 10-13,<br>18-21, 26-29,<br>34-37      |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02590

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

Although the inventions as set forth in claims 1 to 8, 9 to 16, 17 to 24, 25 to 32 and 33 to 40 relate respectively to five compounds obtained by a *beauveria*, the basic skeleton common to these five compound had been publicly known (see, for example, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1993, 66, p.3041-3046). Therefore, these groups of inventions can be regarded as neither a single invention nor a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

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

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ 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 (IPC))                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| Int. Cl <sup>7</sup> C07K5/083, 5/087, C12P21/02, C12N1/14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| 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 <sup>7</sup> C07K5/083, 5/087, C12P21/02, C12N1/14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| 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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| 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)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| REGISTRY/CA (STN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                | 関連する<br>請求の範囲の番号                                         |
| PX<br>PA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | MAREK K et al., Sequencing of new beauverolides by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. J. Mass. Spectrom., Sep. 2001, 36, p. 1108-1115 | 17-24<br>1-16, 25-40                                     |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | MOCHIZUKI K et al., The structures of bioactive cyclodepsipeptides, Beauveriolides I and II, metabolites of entomopathogenic Fungi Beauveria sp.                 | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40                 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Bull. Chem. Soc. Jpn., 1993, 66, p. 3041-3046                                                                                                                    | 2-5, 10-13, 18<br>-21, 26-29, 34<br>-37                  |
| <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。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 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<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「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<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |                                                                                                                                                                  |                                                          |
| 国際調査を完了した日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 04.06.02                                                                                                                                                         | 国際調査報告の発送日                                               |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号 100-8915<br>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)<br>伏見 邦彦 印<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                   |                                            |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                 | 関連する<br>請求の範囲の番号                           |
| X                     | JP 11-279195 A(学校法人北里学園)<br>1999. 10. 12<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                             | 4, 5, 12, 13,<br>20, 21, 28, 29,<br>36, 37 |
| Y                     |                                                                                                                                                                                                   | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A                     |                                                                                                                                                                                                   | 2, 3, 10, 11,<br>18, 19, 26, 27,<br>34, 35 |
| X                     | NAMATAME I et al, Beauveriolides, specific inhibitors of lipid<br>droplet formation in mouse macrophages, produced by Beauveria<br>sp. FO-6979<br>The Journal of Antibiotics, 1999, 52(1), p. 1-6 | 4, 5, 12, 13,<br>20, 21, 28, 29,<br>36, 37 |
| Y                     |                                                                                                                                                                                                   | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A                     |                                                                                                                                                                                                   | 2, 3, 10, 11,<br>18, 19, 26, 27,<br>34, 35 |
| Y                     | ALEXANDR J et al, Beauverolides L and La from beauveria<br>tenella and paecilomyces fumosoroseus.<br>Phytochemistry, 1994, 37(5), p. 1301-1303                                                    | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A                     |                                                                                                                                                                                                   | 2-5, 10-13, 18<br>-21, 26-29, 34<br>-37    |
| Y                     | ELSWORTH J F et al., Cyclodepsipeptides from Beauveria<br>bassiana. Part 2. Beauverolides A to F and their relationship<br>to Isarolide.<br>J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1980, 8, p. 1795-1799  | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A                     |                                                                                                                                                                                                   | 2-5, 10-13, 18<br>-21, 26-29, 34<br>-37    |
| Y                     | GROVE J F et al., Cyclodepsipeptides from Beauveria bassiana.<br>Part 3. The isolation of Beauverolides Ba, Ca, Ja and Ka.<br>J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1980, 12, p. 2878-2880               | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A                     |                                                                                                                                                                                                   | 2-5, 10-13, 18<br>-21, 26-29, 34<br>-37    |
| Y                     | ELSWORTH J F et al., Cyclodepsipeptides from Beauveria<br>bassiana Bals. Part 1. Beauverolides H and I.<br>J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1977, 3, p. 270-273                                     | 1, 6-9, 14-17,<br>22-25, 30-33,<br>38-40   |
| A                     |                                                                                                                                                                                                   | 2-5, 10-13, 18<br>-21, 26-29, 34<br>-37    |

## 第Ⅰ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（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

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

## 第Ⅱ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の国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-8、9-16、17-24、25-32、33-40に記載された発明はそれぞれボーベリア属から得られた5種の化合物に関するものであるが、5つの化合物に共通の基本骨格は公知（例えば、Bull. Chem. Soc. Jpn., 1993, 66, p. 3041-3046、参照）である。したがって、これらは、一の発明であるとも、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとも認められない。

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

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料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なかった。