

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4787752号
(P4787752)

(45) 発行日 平成23年10月5日 (2011. 10. 5)

(24) 登録日 平成23年7月22日 (2011. 7. 22)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 H 17/02 (2006. 01)

C O 7 H 17/02 C S P

C O 7 J 17/00 (2006. 01)

C O 7 J 17/00

A 6 1 K 31/7056 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7056

A 6 1 K 31/7048 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7048

A 6 1 P 39/06 (2006. 01)

A 6 1 P 39/06

請求項の数 11 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-526098 (P2006-526098)
 (86) (22) 出願日 平成16年8月18日 (2004. 8. 18)
 (65) 公表番号 特表2007-505109 (P2007-505109A)
 (43) 公表日 平成19年3月8日 (2007. 3. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/026881
 (87) 国際公開番号 W02005/034846
 (87) 国際公開日 平成17年4月21日 (2005. 4. 21)
 審査請求日 平成18年5月12日 (2006. 5. 12)
 (31) 優先権主張番号 60/501, 985
 (32) 優先日 平成15年9月11日 (2003. 9. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 594114134
 ミシガン ステイト ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 ミシガン州 イーストラ
 ンシング 4 8 8 2 4 アドミニストレイ
 ション ビルディング 2 3 8
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫
 (74) 代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

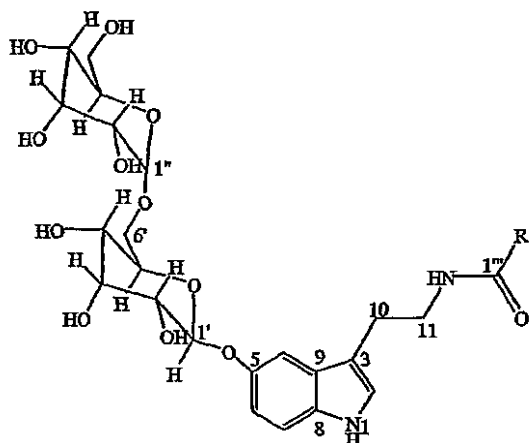
(54) 【発明の名称】 ウィタナミド及びウィタノリド組成物及びその使用法

(57) 【特許請求の範囲】

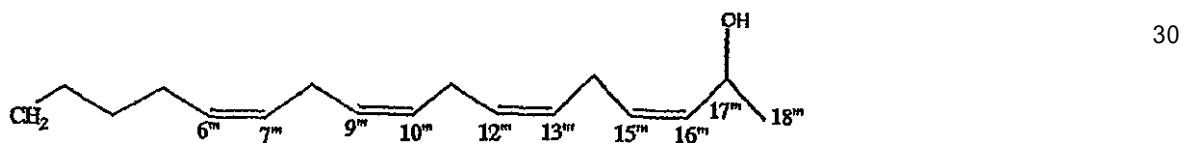
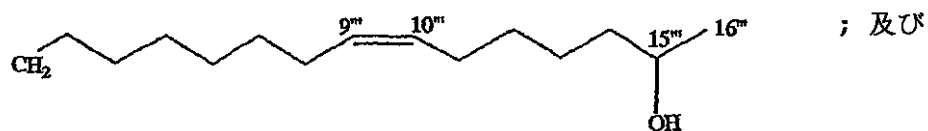
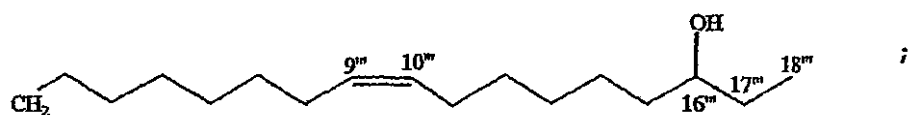
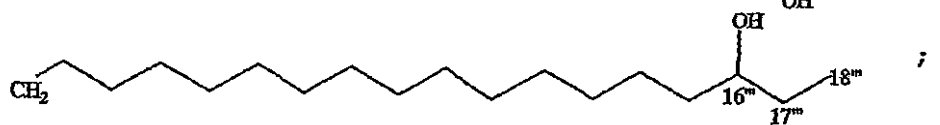
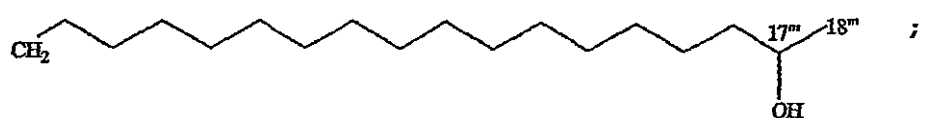
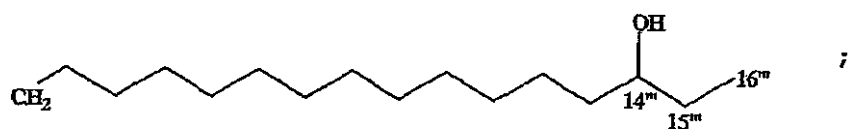
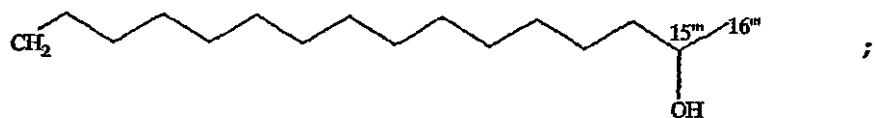
【請求項 1】

下式の単離、精製されたウィタナミド：

【化 1】



[上式中、
 R は、

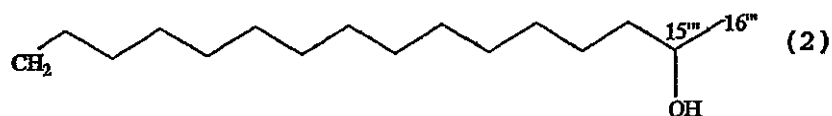
CCCCC/C=C\CCCC(O)CCCCCCCC

R は、

CCCCC=CC=CCCCC(O)C (1)

R は、

【化 4】

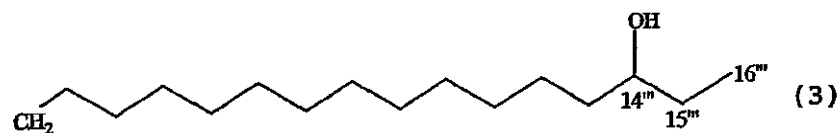


である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

R は、

【化 5】

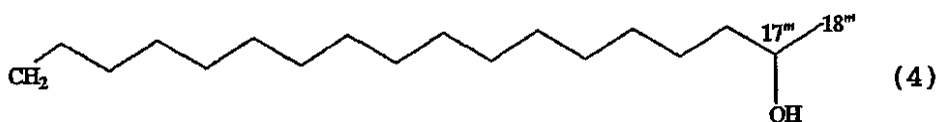


である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

R は、

【化 6】

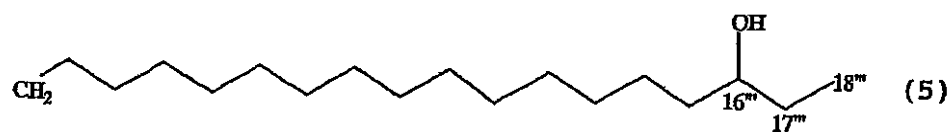


である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

R は、

【化 7】

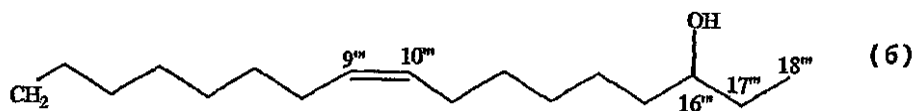


である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

R は、

【化 8】



である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】

R は、

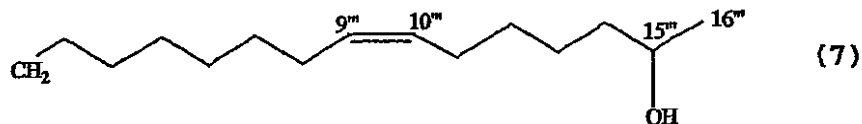
10

20

30

40

【化 9】



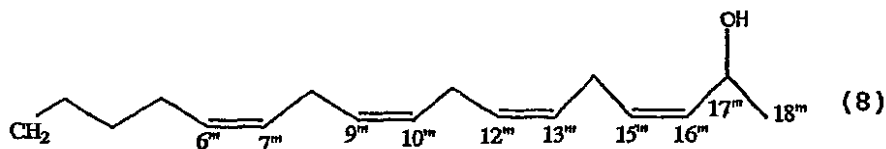
である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】

R は、

【化 10】

10



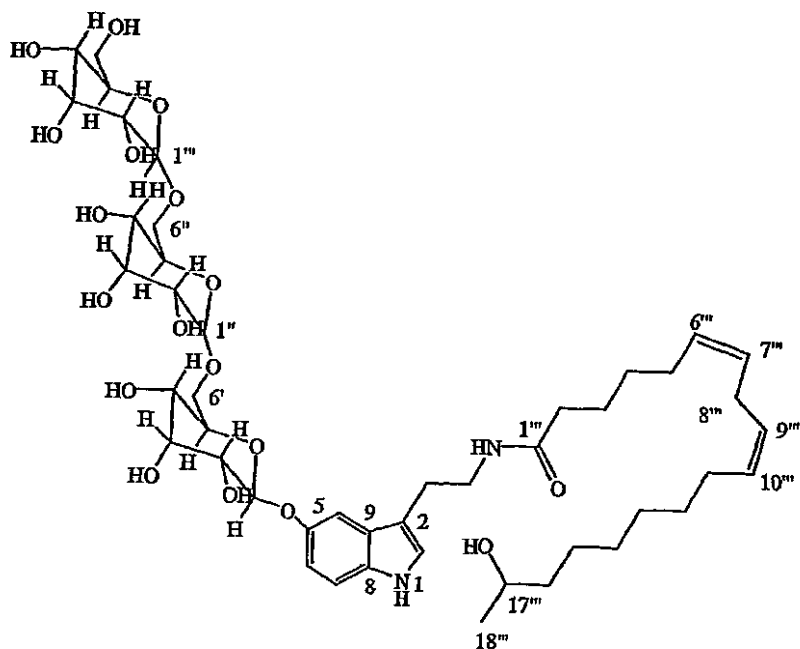
である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 10】

下式の単離、精製された化合物。

【化 11】

20



(9)

30

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 に記載の化合物から成る群から選択される単離、精製された化合物を含む、抗酸化のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

なし

【0002】

本発明は、アルツハイマー病、うつ病、肥満及び偏頭痛などの様々な疾患を治療する際

50

の単離及び精製されたウィタナミド (withanamide) 及びウィタノリド (withanolide) の使用に関する。ウィタナミド及びウィタノリドは特に、ウィタニアソムニフェラ (Withania somnifera) の果実から単離、精製された。

【背景技術】

【0003】

ナス科のウィタニアソムニフェラ (L) デュナル (Withania somnifera (L) Dunal) は、インドの乾燥地域に分布している直立性常緑低木である。アズワガンダ (Aswagandha) として知られている W. ソムニフェラは、原住民治療 (Ayurvedic medicine) におけるその使用に関してよく知られている。アズワガンダ根抽出物は、アデノパシー、関節炎、喘息、高血圧、炎症及びリウマチのための民間療法として報告されている (Thakur, R. S., et al., 「インドの代表的薬草 (Major medicinal plants of India); Ed.; Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants: Lucknow, India, 531 (1989))。W. ソムニフェラの葉も、腫瘍、炎症、結膜炎及び結核を含むいくつかの疾患のための治療薬として使用されている (Thakur, R. S., et al., 「インドの代表的薬草 (Major medicinal plants of India); Ed.; Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants: Lucknow, India, 531 (1989))。現在では、この植物の粉末化された根又は根抽出物は、米国において食品サプリメントとして使用されている。

【0004】

W. ソムニフェラから報告されている主な化学成分は、ウィタノリドと称される。これらの化合物は、C - 22 及び C - 26 が酸化されてラクトンを形成しているエルゴステロール骨格を有する構造的に多様なステロイド化合物である (Ray, A. B., et al., Prog. Chme. Org. Nat. Prod. 63, 1 - 106 (1994))。W. ソムニフェラの根及び葉の化学的研究により、いくつかのウィタノリドが単離、同定された (Matsuda, M., et al., Bioorg. Med. Chem. 9, 1499 - 1507 (2001))。この植物の果実は、とても小さいオレンジ色の液果であり、飽和及び不飽和脂肪酸を含有すると報告されている (Stoller E. W., et al., Lloydia, 37, 309 - 312 (1974) ; Monika, P., et al., Asian J. Chem. 6, 442 - 444 (1994) ; 及び Monika, P., et al., Sci. Phys. Sci. 5, 81 - 83 (1993))。しかしながら、葉及び果実は、生体活性に関して十分には研究されていない。ウィタノリドは、その構造骨格によって分類されており (Ray, A. B., et al., Prog. Chme. Org. Nat. Prod. 63, 1 - 106 (1994))、その構造の多様性が、幅広い薬理学的活性アレイに寄与している。ウィタノリドは、その抗炎症、抗腫瘍、細胞毒、免疫調整活性、並びに CCl₄ 誘発肝毒性に対する保護に関して研究されている (Ray, A. B., et al., Prog. Chme. Org. Nat. Prod. 63, 1 - 106 (1994) ; 及び Anjaneyulu, A. S. R., et al., 「天然産物化学の研究：構造と化学」 (Studies in Natural Products Chemistry: Structure and Chemistry) (Part F); Ed. Atta-ur-Rahman, Vol. 20, 135 - 261 (1998))。これらには動物モデルにおいて II 相酵素を誘発することが報告されており、これががんの化学的予防におけるメカニズムの 1 つと考えられている。 (Misico, R. I., et al., J. Nat. Prod. 65, 677 - 680 (2002) 及び Su, B. N., et al., Tetrahedron 58, 3453 - 3466 (2002))。

【0005】

生命を維持する酸素は、大抵の好気性生物にとって、より高い濃度にさらされると、毒性になる。この毒性の理由は、ミトコンドリア中で酸素が水に変化する間に、スーパーオキシド($O_2^{\cdot -}$)、過酸化水素(H_2O_2)及びヒドロキシル($-OH^{\cdot}$)基が形成することによる。環境汚染から生じた遊離基や、薬物、毒素及びストレスなどの外因子により生じた遊離基は、生体高分子構造及び機能に酸化ダメージをもたらす(Wickens, A. P., *Respiration Physiology*, 128 371-389 (2001))。次いでこれは、アテローム硬化症、心臓血管疾患及びがんを含む多くの疾患プロセスの進行をもたらすであろう。いくつかの研究は、反応性酸素及び窒素の発生と加齢プロセスとを結びつけている(Vaya, J., et al., *Curr. Med. Chem. Imm., Endoc. & Metab. Agents* 1 99-117 (2001))。酸化ストレスはさらに、膵臓細胞の機能を損ない、糖尿病をもたらす(West, I. C., *Diabet Med.* 17 171-180 (2000))。1重項酸素(singlet oxygen)は、多不飽和脂肪酸と反応して、過酸化脂質を形成するが、これは、分解して、変異誘発物質の形成を開始する。したがって、1重項種を捕捉する能力を有する天然産物又は化学物質は、生体障害を低減し、これにより、様々な加齢関連疾患の進行を制限することができる。多くの疫学的研究により、抗酸化物質に富んだ食事は、心疾患、がん、糖尿病及びアルツハイマー病の予防において主要な役割を果たすことが判明している(Temple, N. J., *Nutr. Res.* 20 449-459及びそこに挙げられている参考文献(2000))。

10

【0006】

20

うつ病又は不安のために処方される医薬品のうちの数種は、天然抗酸化物質を含有する。アスコルビン酸、ピリドキシン、カロテン、ビタミンE、Zn、ニコチンアミド及びSeの混合物が、うつ病又は不安を治療するために有効に使用されている(Horrobinn, D. F., *PCT 国際出願WO98-48788*, A1 19981105 (1998))。天然抗酸化物質は、脂質過酸化を阻止し、食品の栄養品質を維持する食品添加物として使用される。さらに、抗酸化物質は、がん治療の間の化学療法の副作用を低下させることが知られている(Conclinn, K. A., *Nut. Canc.* 37 1-18 (2000))。食品での脂質過酸化を予防するために使用される合成抗酸化物質は、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、没食子酸プロピル(PG)及びt-ブチルヒドロキノン(TBHQ)である。しかしながら、合成抗酸化物質は、発ガン物質でありうると考えられ(Marchant, C. A., *Env. Health Persp. Supp.* 104 1065-1073 (1996))、したがって、安全な天然抗酸化物質を開発することには大いに関心がある。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、本発明の課題は、ウィタナミド及びウィタノリド治療を受け入れ可能な哺乳動物の疾患を阻害するための組成物及び方法を提供することである。この課題及び他の課題は、下記の記載及び図面を参照することにより、さらに明白になるであろう。

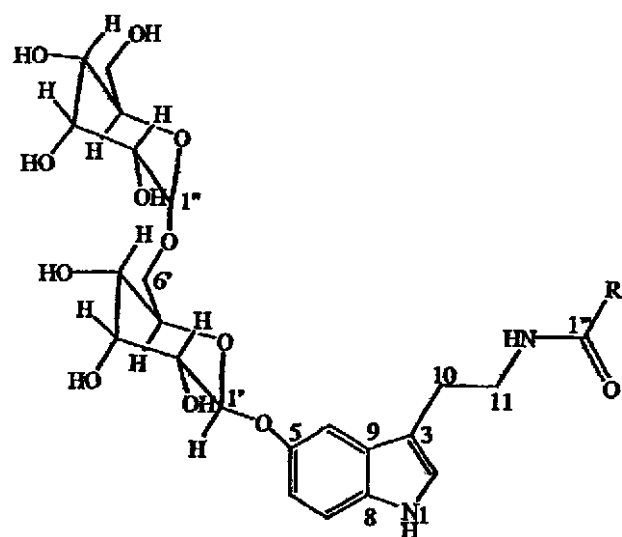
【課題を解決するための手段】

40

【0008】

本発明は、下式の単離、精製されたウィタナミドに関する：

【化 1】

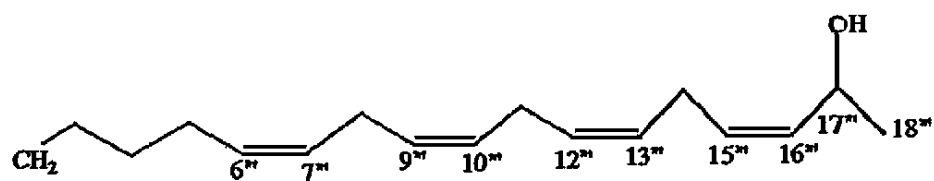
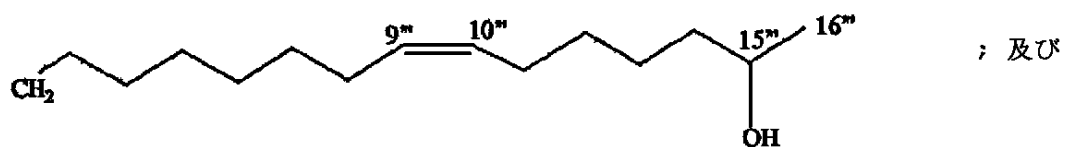
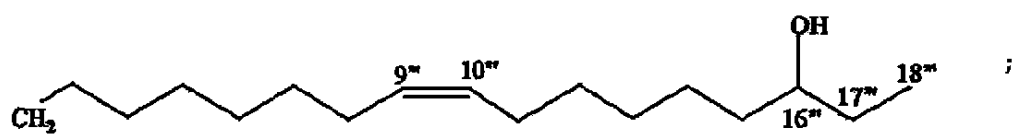
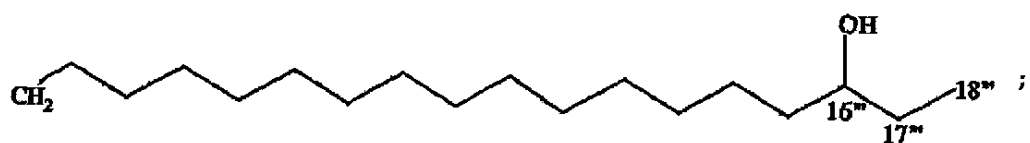
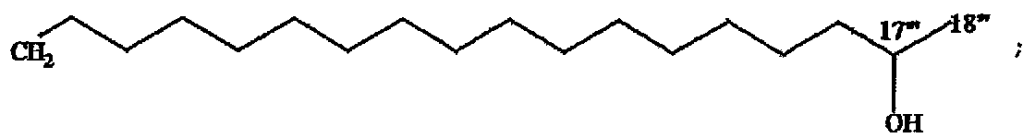
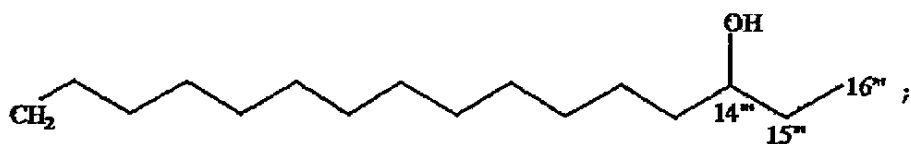
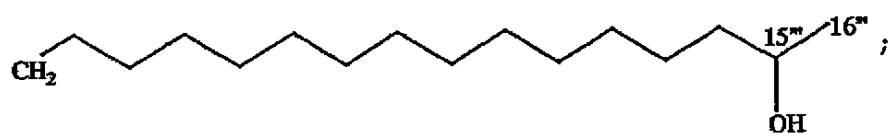
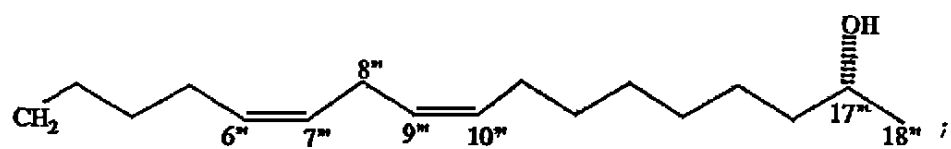


10

[上式中、
R は、

20

【化 2】



; 及び

10

20

30

40

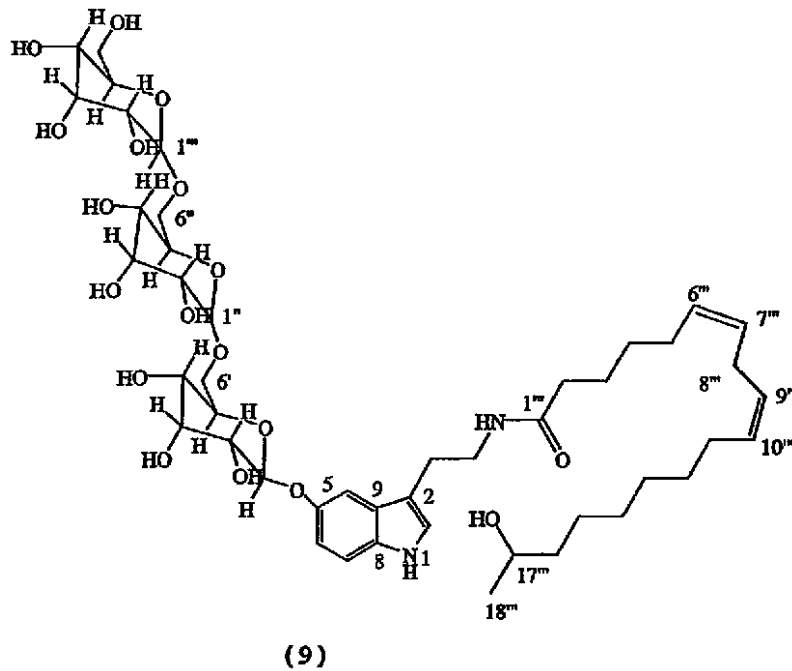
50

からなる群から選択される]。

【0009】

本発明はさらに、下式の単離、精製された化合物に関する。

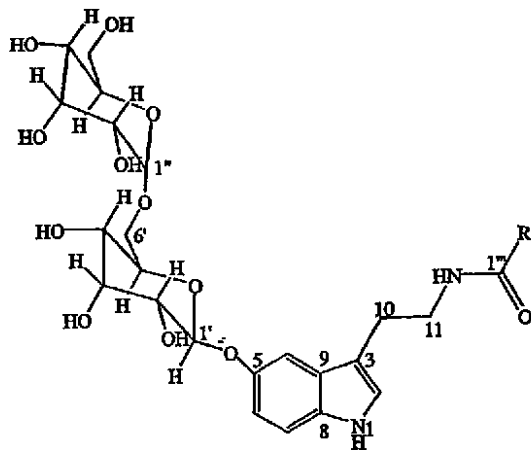
【化3】



【0010】

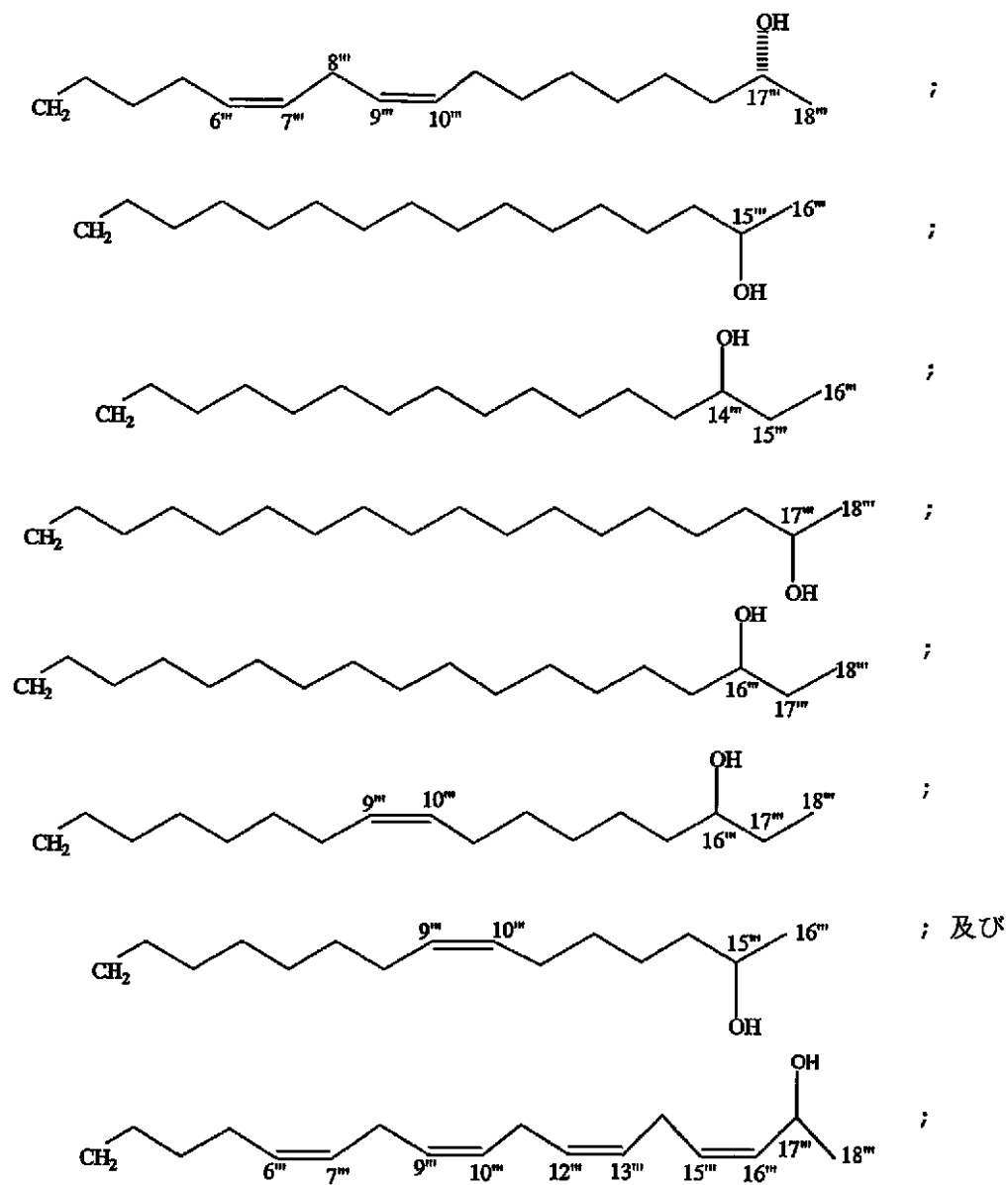
さらに本発明は、哺乳動物における疾患を *in vivo* で治療する方法であって、単離、精製された下式の化合物：

【化4】



[上式中、
R は、

【化 5】



10

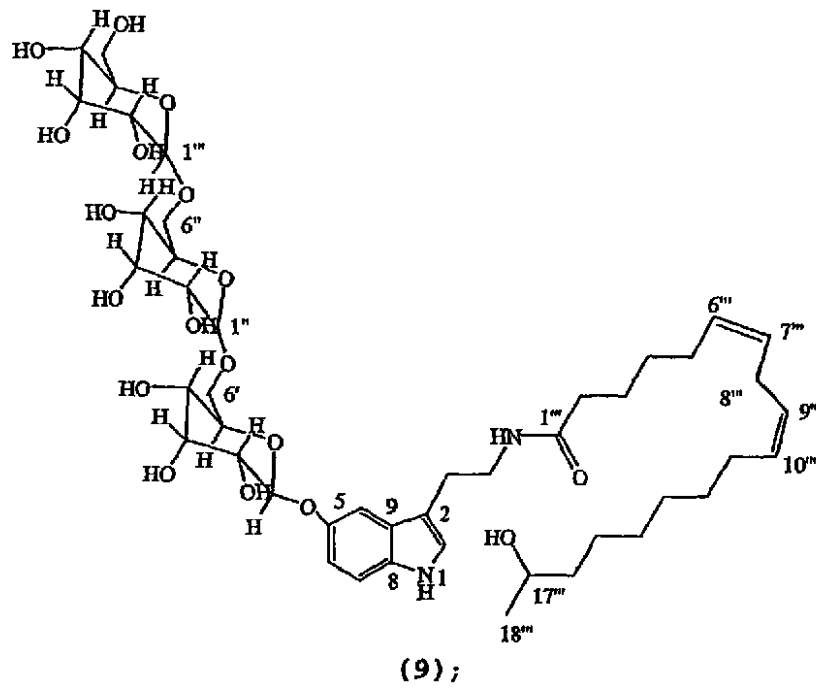
20

30

からなる群から選択される]；

下式の化合物：

【化 6】

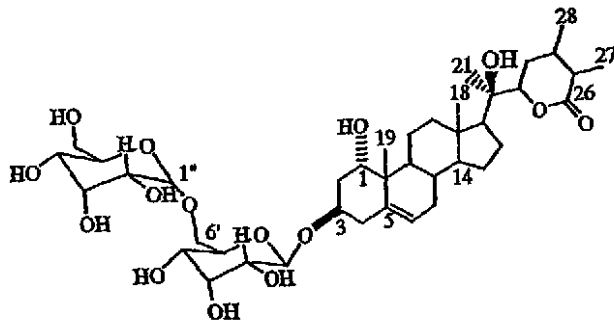


10

20

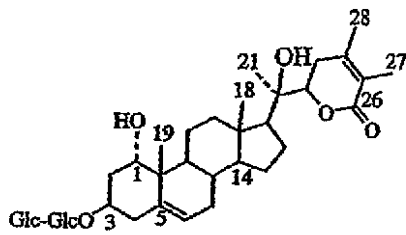
下式の化合物：

【化 7】



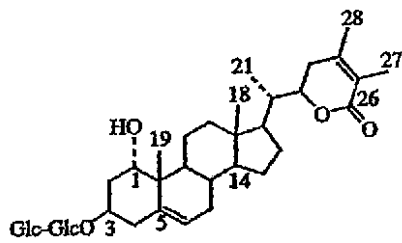
(10);

10



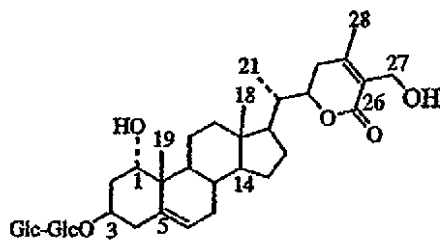
(11);

20



(12); 及び

30



(13)

40

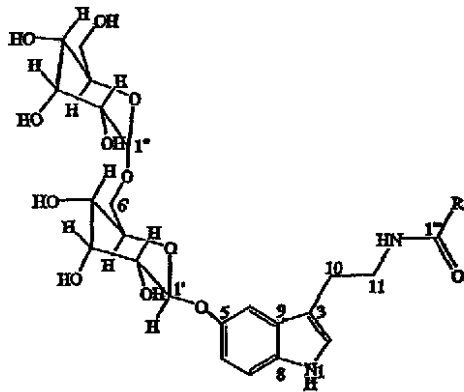
及びこれらの混合物を、それを必要とする哺乳動物に投与して、前記哺乳動物を治療することを含む、方法に関する。

50

【 0 0 1 1 】

さらに本発明は、その必要のある組成物に酸化をもたらす (p r o v i d i n g o x i d a t i o n) 方法であって、

【 化 8 】

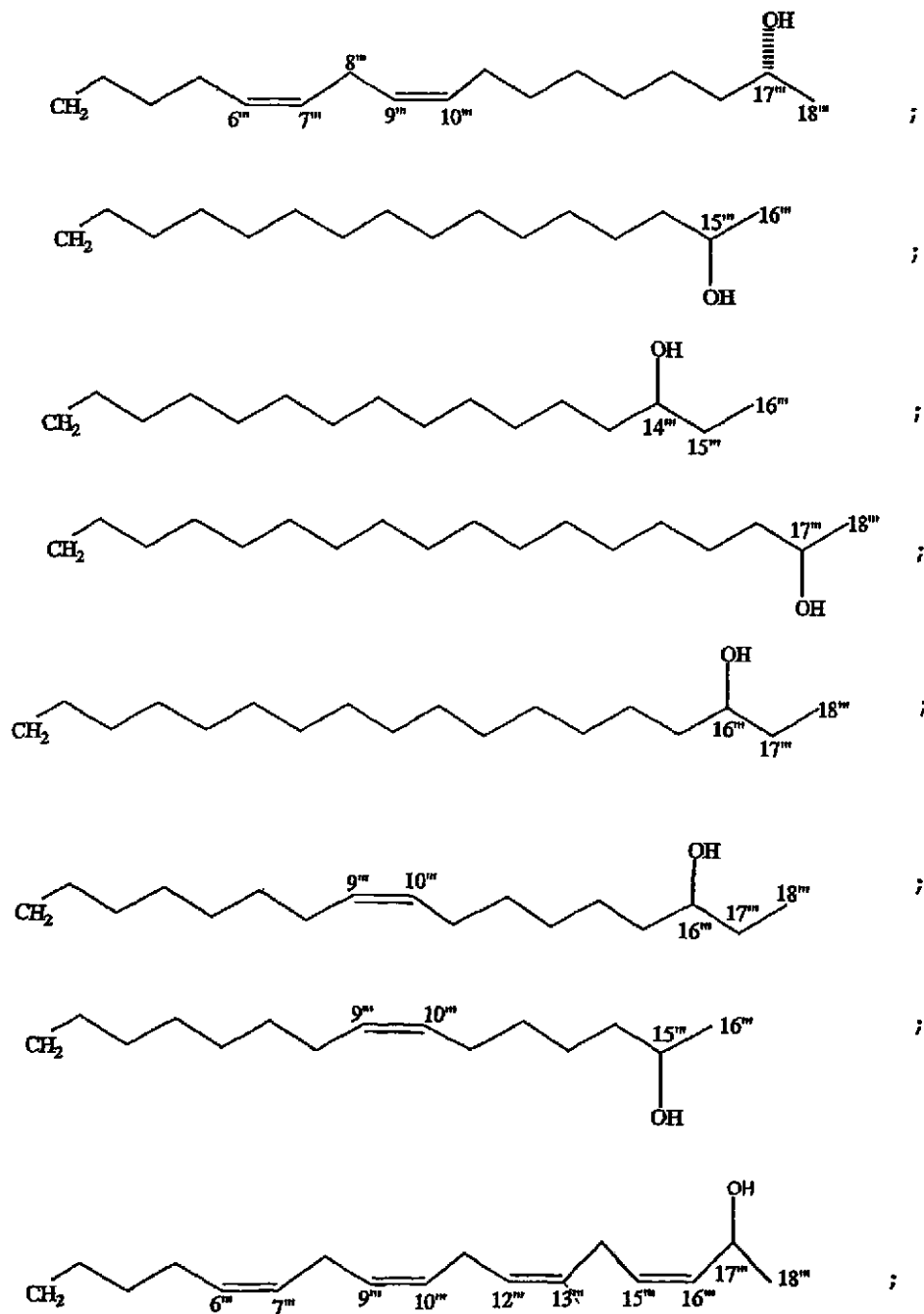


10

[上式中、

R は、

【化 9】



10

20

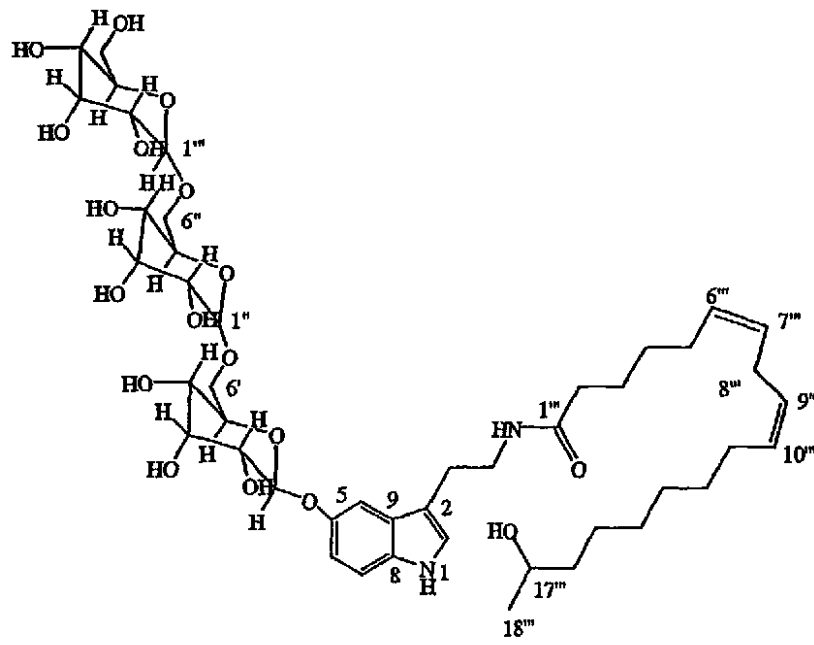
30

からなる群から選択される] ;

下式の化合物 :

40

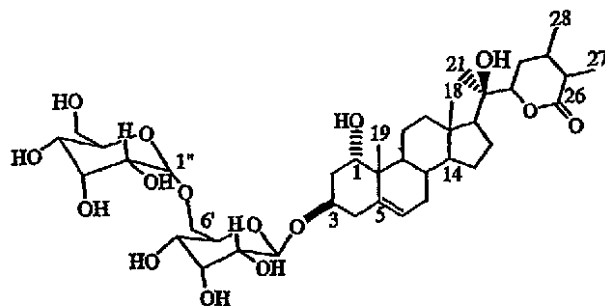
【化 10】



(9) ;

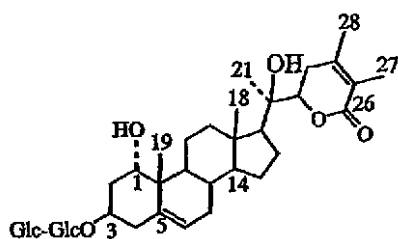
下式の化合物：

【化 1 1】



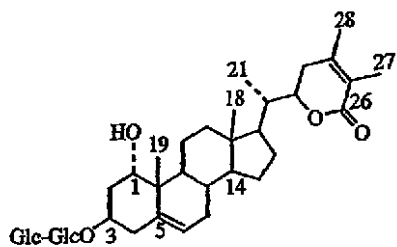
10

(10);



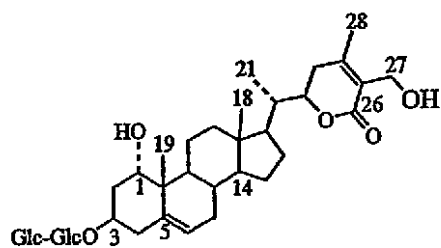
20

(11);



30

(12); 及び



40

(13)

並びにこれらの混合物からなる群から選択される単離及び精製された化合物を有効量で、組成物に加えることを含む、方法に関する。

50

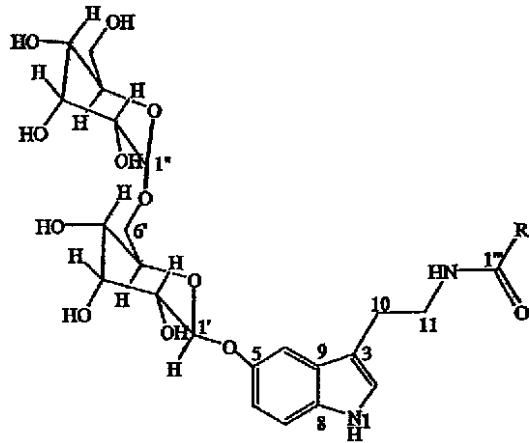
【 0 0 1 2 】

本発明はさらに、

(a) 抗酸化活性を必要とする組成物と、

(b) 抗酸化活性をもたらすに十分な量の、

【 化 1 2 】

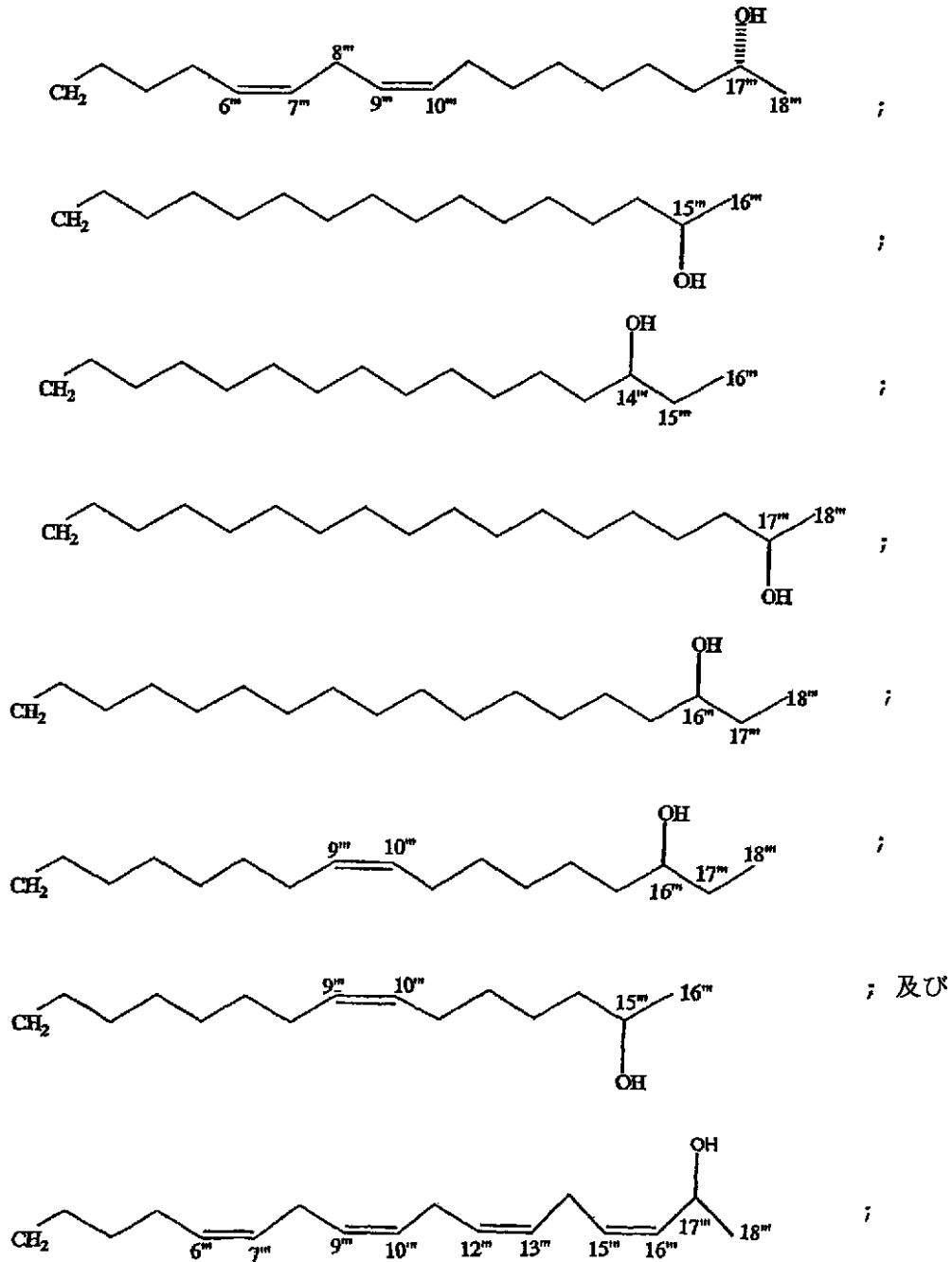


10

[上式中、
R は、

20

【化 1 3】



からなる群から選択される] ;

下式の化合物 :

10

20

30

40

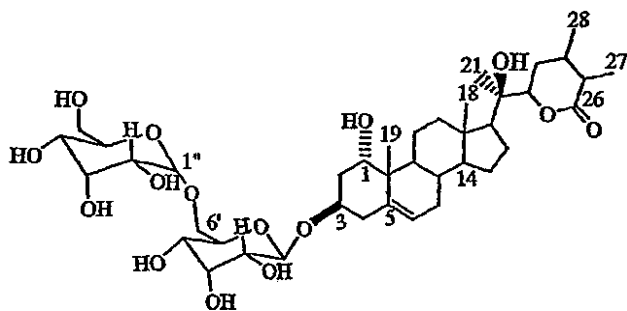
10



(9) :

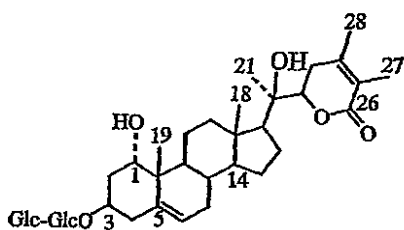
下式の化合物：

【化 1 5】



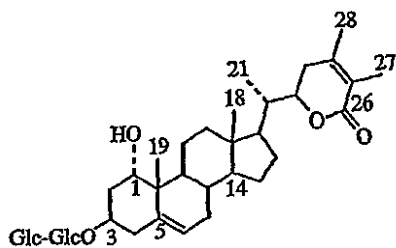
(10);

10



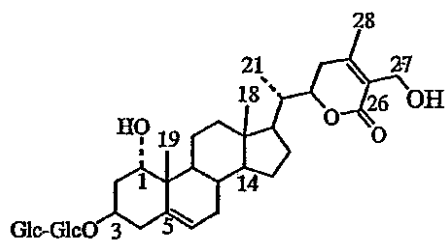
(11);

20



(12); 及び

30



(13)

40

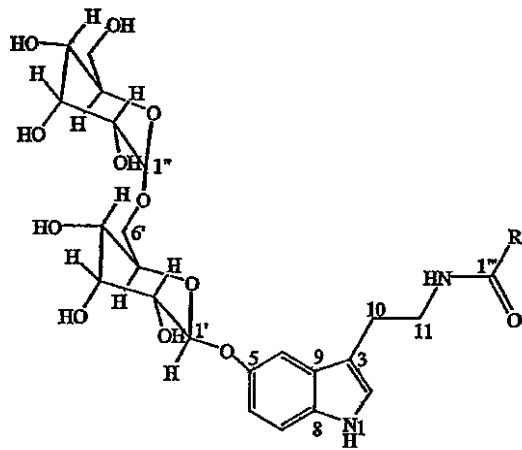
並びにこれらの混合物からなる群から選択される単離、精製された化合物とを含む組成物に関する。

【 0 0 1 3 】

本発明はさらに、医薬品として使用するための組成物であって、

50

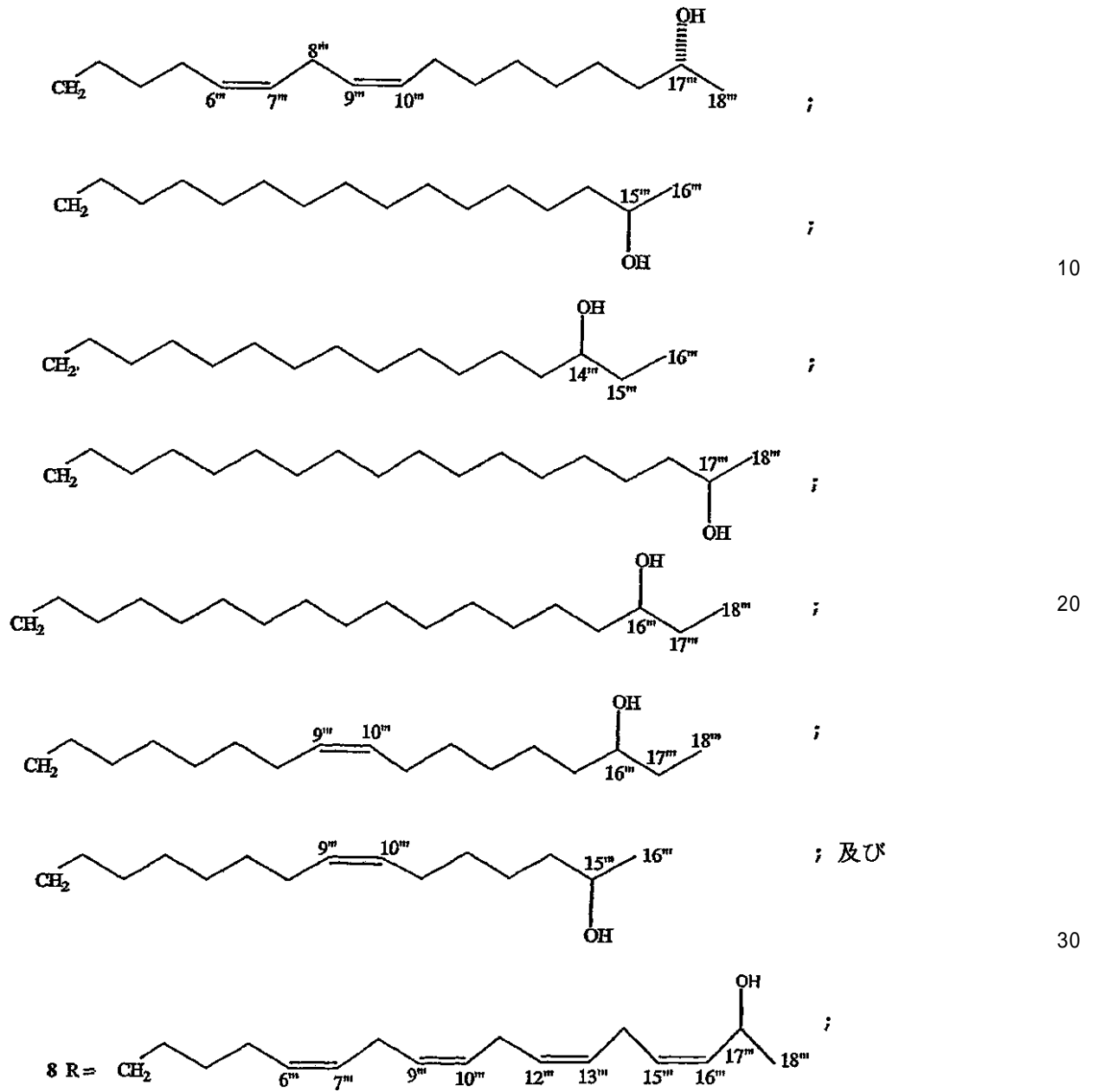
(a)
【化 1 6】



10

[上式中、
R は、

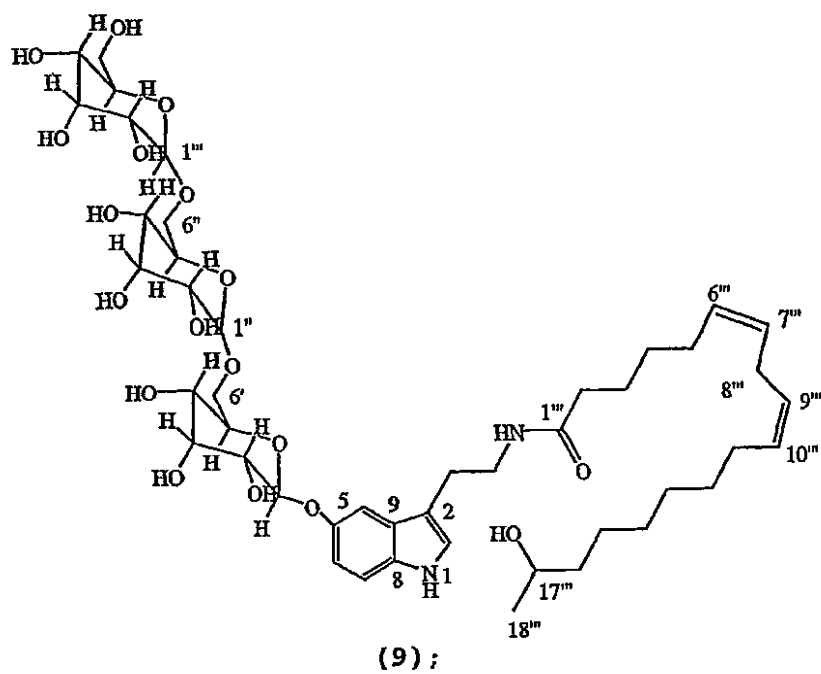
【化 17】



からなる群から選択される] ;

下式の化合物 :

【化 18】

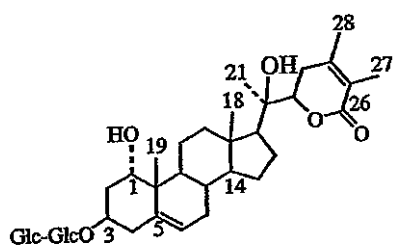


10

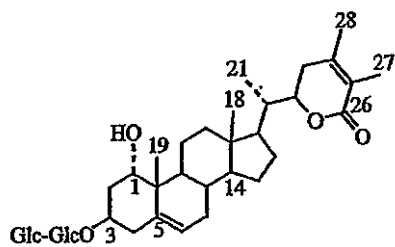
20

下式の化合物：

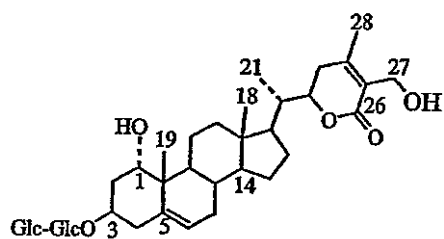
10



20



30



40

を含む、組成物に関する。

本発明はさらに、患者におけるアルツハイマー病、肥満、偏頭痛及びうつ病からなる群

から選択される疾患を治療する方法であって、ウィタナミド、ウィタノリド及びこれらの混合物を含有する組成物を有効量で患者に投与して、うつ病を緩和することを含む、方法に関する。

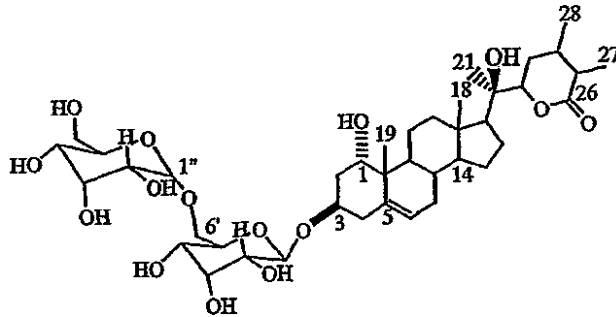
【 0 0 1 5 】

さらに本発明は、*in vivo*での哺乳動物の抗酸化治療法であって、有効量のウィタナミド、ウィタノリド及びこれらの混合物を哺乳動物に投与して、前記哺乳動物の抗酸化治療をもたらすことを含む、方法に関する。

【 0 0 1 6 】

さらに本発明は、下式の単離及び精製されたウィタノリドに関する。

【化 2 0】



(10)

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 7 】

本出願に挙げられている特許、特許出願、政府刊行物、政府規制及び文献参照は全て、参照により、その全体を本願明細書に援用する。矛盾する場合には、定義を含め本発明の記載が優先する。

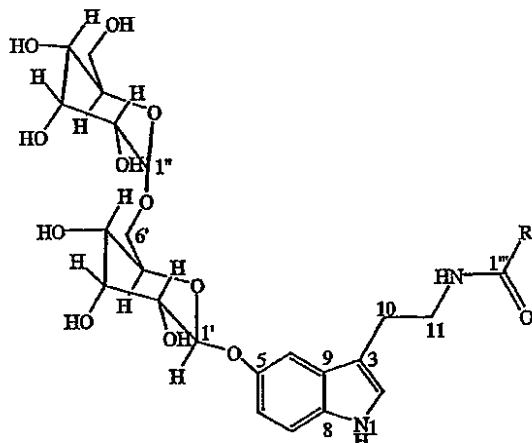
【 0 0 1 8 】

W. ソムニフェラの種の抽出物は、優れた脂質過酸化阻害活性を有することが発見されている。W. ソムニフェラ種子抽出物からのいくつかの新規のウィタナミド及びウィタノリド並びにいくつかの既知のウィタノリドの単離及び同定を、開示する。

【 0 0 1 9 】

ウィタニアソムニフェラ果実のメタノール抽出物のバイオアッセイ誘導精製により、新規のウィタナミドA～I (1～9)、新規のウィタノリド(10)及び3種の既知のウィタノリド(11～13)が得られた。

【化 2 1】



10

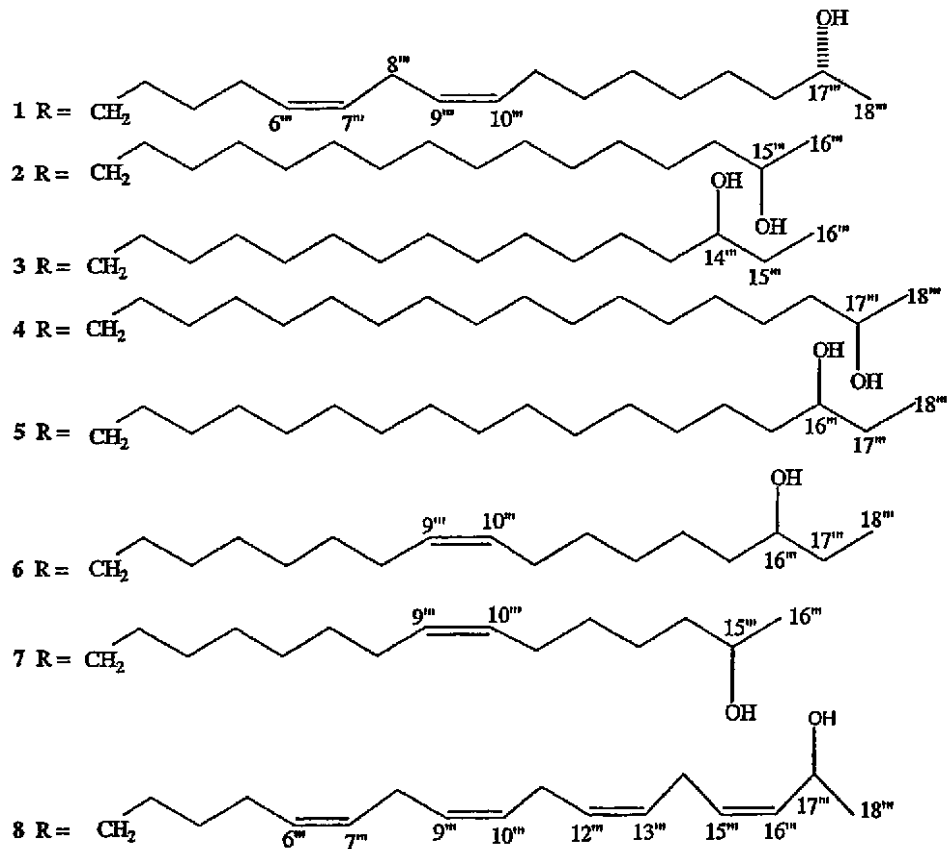
20

30

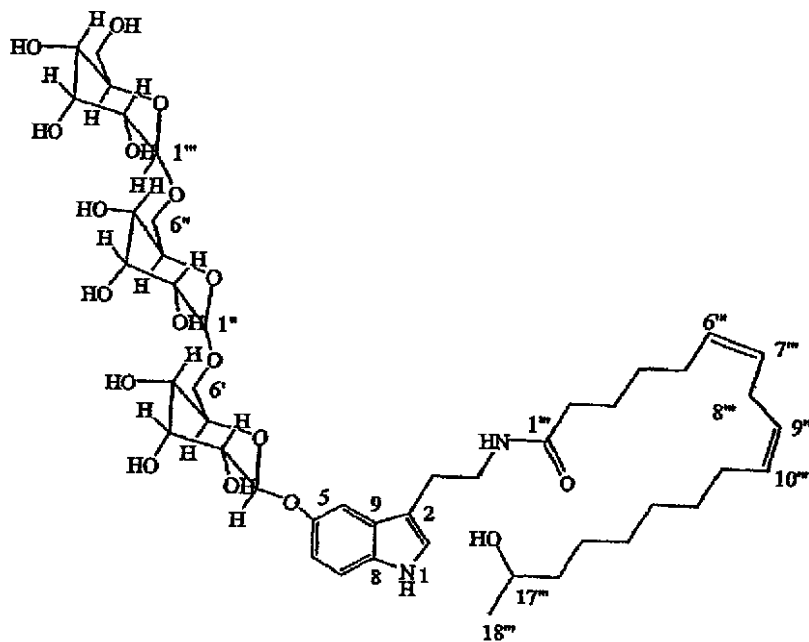
40

50

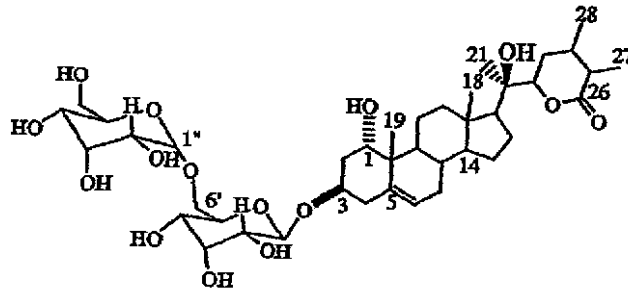
[上式中、
R は、
【化 2 2 - 1】



からなる群から選択される]；

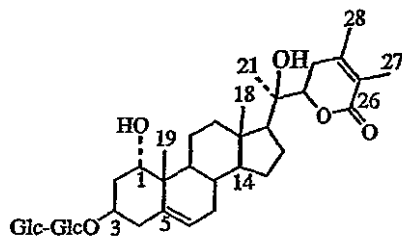


【化 2 2 - 2】

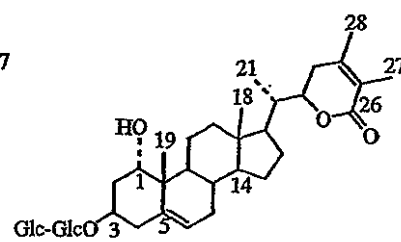


10

10

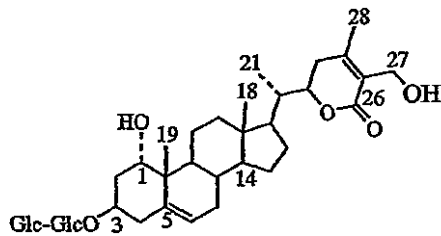


11

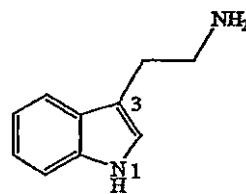


12

20

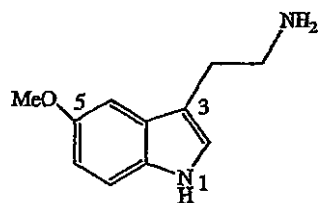


13

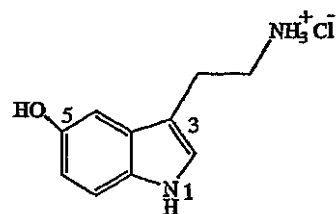


14

30



15



16

40

【 0 0 2 0】

これらの化合物の構造を、FABMS、HRFAMBS、ID-及び2D-NMRスペクトル実験を使用することにより決定した。ウィタナミドA~I(1~9)は、長鎖ヒドロキシル脂肪酸と結合しているグリコシル化セロトニンであることが判明した。長鎖脂肪酸部分に位置するヒドロキシル基の立体化学を、化合物1に関して変更Mosherエステル法により決定した。化合物1~13を、大きな単膜ベシクル(LUV)を使用するモデル系で脂質過酸化を阻害する能力に関して試験した。ウィタナミド1~5及び9は、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ で、脂質過酸化をそれぞれ98、93、79、94、81及び86%阻害した。しかしながら、化合物6~8は、 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ で、過酸化脂質をそれぞれ85、8

50

2 及び 90 % 阻害した。ウィタノリド 10 及び 13 は $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ で試験し、このアッセイでは 84 % 及び 25 % の阻害が得られた。化合物 11 及び 12 は、 50 及び $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、脂質過酸化をそれぞれ 86 及び 82 % 阻害した。ウィタナミド A ~ I の構造活性相関 (SRA) を評価するために、化合物 14 ~ 16 を購入し、同じリポソームモデル系を使用して、その抗酸化活性を決定した。食品防腐剤として使用されている市販の抗酸化物質ブチル化ヒドロキシアニソール (BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT) 及び t - ブチルヒドロキノン (TBHQ) をさらに、この方法で $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で試験すると、それぞれ、80、81 及び 85 % の阻害を示した。本発明の結果は、この新規の群の化合物により示される有望な抗酸化活性は、ヒドロキシル置換を伴う長鎖アシル基によると考えられることを教示している。これは、セロトニンに対するヒドロキシル脂肪酸及びグルコース単位の珍しい結合を伴うセロトニン結合体の初めての報告である。

10

【0021】

W. ソムニフェラの果実を、ミシガン州立大学の Bioactive Natural products and Phytochemical Laboratory (East Lansing, Michigan) の温室で育成した植物から集めた。果実を粉砕し、室温でヘキサン、EtOAc、MeOH 及びアンモニア MeOH ($\text{pH} = 11$) で順次抽出した。ヘキサン及び EtOAc 抽出物は、TLC 及び GCMS により確認したところ、 α -カロテン及び脂肪酸を含有していた。

【0022】

MeOH 抽出物の抗酸化アッセイ誘導分画により、5 種の生物活性なフラクションが得られた。CC、逆相 HPLC 及び分取 TLC による活性フラクションの精製により、9 種の新規ウィタナミド A ~ I (1 ~ 9)、1 種の新規のウィタノリド及び 3 種の既知のウィタノリドが得られた。

20

【0023】

ウィタナミド A (1)、H (8) 及び I (9)

ウィタナミド A (1) は、 $[\alpha]_D^{25} = -35^\circ$ を有する淡褐色の非晶質粉末として得られた。1 の HRFABMS は、 m/z 779.4329 (算出値 779.4330) で $[\text{M} + \text{H}]^+$ イオンを示し、 $\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{13}$ としてその分子式を示した。IR スペクトルは、 1633 、 3413 cm^{-1} に吸収帯を示し、分子中にアミドカルボニル及びヒドロキシル基が存在することを示した。 6.66 、 6.92 、 6.99 及び 7.15 でのプロトン NMR シグナルは、5 - 酸化トリプタミン誘導体¹⁴ に特徴的であり、それぞれ C - 6、C - 4、C - 2 及び C - 7 プロトンに割り当てた。それぞれ 1 個のプロトンに集積される 4.38 及び 4.30 での 2 つの二重項は、アノマープロトンに由来し、化合物 1 が二糖を含むことを示した。 2.84 及び 3.42 で観察された 2 つの三重項は、トリプタミン部分のそれぞれ H - 10 及び H - 11 に割り当てた。 1.27 でのブロード 1 重項に加えて、 2.12 での 3 重項は、 5.31 での 4 個のプロトンに集積される多重項と共に、その構造中に不飽和脂肪酸部分が存在することを示した。2 重項として現れる 1.19 での末端メチルシグナルは、脂肪酸部分の C - 17 でのメチン炭素を明らかにした。さらに、1 個のプロトンに集積される 3.79 での多重項により、C - 17 でのヒドロキシル部分が確認された。 2.04 、 2.30 及び 2.75 でのシグナルは、分子中のアリルメチレンプロトンに割り当てた。 1.12 、 4.11 、 2.6 、 1.12 、 5.15 、 1.0 及び 1.33 、 0 での ^{13}C NMR シグナルはそれぞれ、5 - 酸化トリプタミン部分の C - 6、C - 7、C - 3、C - 5 及び C - 9 に帰した。 176.2 でのシグナルは、ヒドロキシ脂肪酸成分が、アミド結合により 5 - 酸化トリプタミン部分に結合していることを示した。 77.7 及び 22.1 でのシグナルは、それぞれ側鎖のヒドロキシル及びメチル炭素に帰していた。アリル炭素に帰する 28.2 、 28.1 及び 26.5 での炭素シグナルは、化合物 1 中での Z としての二重結合の配置を示した。それというのも、E 異性体中のアリル炭素は、 32 ppm 付近に現れるためである (Spinel, A., et al., J. Org. Chem. 62 5471 - 5475 (1997)); 及び Wenkert, E., et al., In Topics in¹³

30

40

50

C NMR spectroscopy; Levy, G. C., Ed.; Wiley - Interscience: New York, Vol. 2, p 81 - 121)。

【0024】

1の酸加水分解により、セロトニン及び脂肪酸に加えて、唯一の糖としてグルコースが得られた。グルコースの同定を、グルコースの基準試料と加水分解からの生成物のTLCとの比較により行った。C - 6'' に対して7 ppmほどの、C - 6' で観察されたダウフィールドシフトは、グルコース部分の1'' - 6' 結合を示した。¹H - 及び¹³C NMRシグナルと文献値との比較により、化合物1中の2糖単位は、ジグルコシドとして同定された(Jayaprakasam, B., et al., Tetrahedron 59 841 - 849 (2003))。

10

【0025】

その構造の付加的な証明が、そのMS細分化パターン、NOESY、HMBC及びCOSY研究から得られた。そのMSで観察されたm/z 617でのイオンにより、分子イオンからの1個のグルコース単位の喪失が確認された。m/z 455でのフラグメントは、アグリコン部分に割り当てられ、ヒドロキシ脂肪酸側鎖が18 - 炭素を含むことを示した。ジグルコシド単位は、H - 1' とH - 4とのNOESY相関に基づきC - 5に位置した(図1)。さらに、4.30でのH - 1'' と69.7でのC - 6' とのHMBC相関により、グルコース成分の1'' - 6' 結合が確認された(図1)。化合物1のTOCSYスペクトルデータにより、それぞれC - 6'' ' 及びC - 9'' ' での二重結合の位置が確認された。3.79でのヒドロキシルプロトン多重項は、そのCOSYスペクトルではメチル基に対応付けられ、C - 17での-OHの帰属を支持し、さらに、HMBC相関により確認された(図1)。

20

【0026】

C - 17での絶対配置を、Mosherエステル法により決定した(Reznaka, T., et al., Phytochemistry 54 635 - 645 (2000))。化合物1をそれぞれ個別に、R(-)及びS(+) メトキシトリフルオロフェニルアセチル塩化物(MTPA)と無水ピリジン中で反応させた。反応混合物を精製すると、R及びS - MTPAエステル誘導体を得られた。生じたエステルの¹H NMR分析により、S - MTPAエステル中のC - 18は、R - MTPAエステルにおいてよりも低いフィールドに現れることが判明した(支持情報)。同様に、S - MTPAエステル中のH - 16は、R - MTPAエステルにおいてよりも高いフィールドで現われた。H - 18及びH - 16での(_S - _R)値は、それぞれ+0.03及び-0.02であり、これにより、RとしてのC - 17での配置が確認された(Reznaka, T., et al., Phytochemistry 54 635 - 645 (2000))。

30

【0027】

化合物8は、分子イオンをm/z 775.4013でもたらした。また、その¹H - 及び¹³C - NMRスペクトルで観察された化合物1との相似は、8がその側鎖に2個の付加的なオレフィン結合を有するウィタナミドであることを示し、これは、さらに5.34での8H多重項及びそれぞれ132.6、132.2、131.4、130.1、128.7及び128.5での¹³C NMRシフトにより支持される。6Hに関して集積される2.82でのシグナルは、C - 6'' ' とC - 7'' '、C - 9'' ' とC - 10'' '、C - 12'' ' とC - 13'' '、及びC - 15'' ' とC - 16'' ' とのオレフィン結合に位置するメチレン基に帰する。これらの二重結合のうちの1つは、C - 15'' ' 及びC - 16'' ' に位置する。それというのも、このオレフィン多重項は、そのTOCSYスペクトルにおいてこのメチル二重項に対応付けられ(図2)、これはさらに、末端メチル基の1.24 ppmへのダウフィールドシフトにより証明された。アリル炭素がそれぞれ、その¹³C NMRスペクトルにおいて26.、6、27.0及び28.2に現われるので、二重結合の配置は、Zと推測される。したがって、ウィタナミドHは、8に示されているように、11, 15 - デヒドロウィタナミドAであることが確認された。

40

【0028】

50

化合物 9 も、そのセロトニン及びヒドロキシル脂肪酸部分での化学シフトにより示されるように、化合物 1 のデータと類似の ^1H - 及び ^{13}C - NMR スペクトルデータが得られた。脂肪酸部分中に 2 個の二重結合が存在することが、 5.33 ppm での 4H 多重項により確認された。 $m/z\ 941.4857$ での $[\text{M} + \text{H}]^+$ イオンにより、9 の分子式が $\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{O}_{18}\text{N}_2$ であることが確認された。加えて、 4.32 、 4.36 及び 4.39 で現われた 3 種のアノマープロトンの存在は、ウィタナミド I (9) がトリグルコシドであることを示した。ウィタナミド A (1) の場合と同様に、2 個のグルコース単位の結合が、 $\text{C}6'$ プロトンのダウンフィールドシフトにより示されるように、 $\text{C}-1''$ $\text{C}-6'$ として確定された。同様の結合が、第 3 のグルコース部分に関して確定された。したがって、9 におけるグルコシド単位が、 $-\text{D}-\text{グルコピラノシル}(1''-6')$ $-\text{D}-\text{グルコピラノシル}(1'''-6'')$ $-\text{D}-\text{グルコピラノシド}$ と確定された。化合物 9 の ^1H - NMR において、2 重項として末端メチル基が現われたことにより、化合物 9 中の長鎖脂肪酸成分の末端置換は、ウィタナミド A (1) と同様であることが示された。

【0029】

ウィタナミド B ~ E (2 ~ 5)。

-34° の $[\]_D$ を伴う無色の非晶質粉末であるウィタナミド B (2) は、 $m/z\ 755.4330$ に $[\text{M} + \text{H}]^+$ を示し、 $\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{N}_2\text{O}_{13}$ として分子式が確認された (算出値 755.4331)。2 の ^1H - 及び ^{13}C - NMR スペクトルは、 5.32 にオレフィンプロトンシグナルが存在しない化合物 1 のスペクトルと非常に似ていた。2 の分子イオンは、化合物 1 のものよりも 24 amu 少ない。このことは、2 中の側鎖は飽和されていて、16 個の炭素のみを含むことを示していた。グルコース成分内の結合は、 69.7 への $\text{C}-6$ - ダウンフィールドシフトにより、且つ $\text{C}-1''$ 及び $\text{H}-6'$ の間に観察される HMB C 相関により、 $1''-6'$ であることが明らかになった (図 3)。メチルプロトンは、その HMB C スペクトルにおいて、 77.7 での炭素に相関しており、 $\text{C}-15'''$ での $-\text{OH}$ 置換が確認された (図 3)。2 の提示された構造は、HMQC、HMB C、DEPT 及び NOESY 実験により確認された。

【0030】

化合物 3 の ^1H - NMR は、 0.91 での $-\text{CH}_3$ 3 重項を除いて、化合物 2 に似ていた。加えて、これにより、化合物 2 と同一の分子式 $\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{N}_2\text{O}_{13}$ が得られた。このことは、化合物 3 が 2 の異性体であることを示していた。3 の ^{13}C - NMR スペクトルでの主要な差異は、メチレン基の 1 つのアップフィールドシフトであり、これは、 26.3 で現われた。通常の脂肪酸 (14.0 ppm) に比較して 10.1 でのメチル炭素の出現及び長鎖ヒドロキシル炭素のダウンフィールドシフト (82.0) は、 $\text{C}-14'''$ にヒドロキシル基が存在することを示していた。 0.91 での 3 重項は、 3.63 でのプロトンに関連している 1.52 でのメチレンプロトンとの COSY 相関を示し、 $\text{C}-14'''$ でのヒドロキシル部分を支持した (図 3)。 $\text{C}-14'''$ での $-\text{OH}$ の存在はさらに、 0.91 でのメチル 3 重項と 82.0 でのヒドロキシル炭素との HMB C 相関により実証された (図 3)。したがって、化合物 3 は、2 の位置異性体と確認された。

【0031】

化合物 4 の MS は、 $m/z\ 805.4462$ で $[\text{M} + \text{Na}]^+$ イオンを示し、その分子式が $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{O}_{13}\text{N}_2$ と確認された。4 の ^1H - 及び ^{13}C - NMR スペクトルデータは、化合物 2 のスペクトルデータと似ていて、分子中の飽和側鎖を示していた。さらに、MS データにより、化合物 4 中の側鎖が 18 個の炭素を含むことが確認された。

【0032】

淡褐色の固体である化合物 5 は、 $m/z\ 783.4645$ で $[\text{M} + \text{Na}]^+$ イオンを示し、その分子式が $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{13}$ と確認された。5 の ^1H - NMR スペクトルデータは、ウィタナミド C (3) と似ていて、飽和側鎖の存在を示した。 0.91 でのメチル 3 重項は、化合物 5 中の末端炭素は、3 と同様の置換パターンを有することを示した

。3に比較して28 amuの分子イオンの差は、5に2個の付加的なメチレン基が存在することを示していた。したがって、化合物5は、C-16''にヒドロキシル基を伴うヒドロキシル酸脂肪酸側鎖中に18個の炭素を有していた。したがって、化合物5は、4の位置異性体であった。

【0033】

ウィタナミドF及びG(6、7)。

ウィタナミドF(6)は、少量不純物として脂肪酸グリコシドを有する分離不可能な混合物として得られた。6の¹H NMRデータは、ウィタナミドA(1)と類似していた。しかしながら、これは、側鎖中に二重結合に由来する5.33での2H多重項を示した。化合物6中に、82.0での炭素に関するシグナルと共に、0.91でのメチル3重項が現われることは、脂肪酸成分中の末端炭素が、化合物3及び5と同様の置換パターンを有することを示した。6中のオレフィン炭素は、それぞれ130.9及び130.7に現われた。したがって、これら2個のオレフィン炭素の化学シフトは、0.2 ppm異なり、オレフィン部分は、C-9に割り当てられた。二重結合の配置は、C-8及びC-11が28.1で現われたので、Zと推測された(Spinnell, A., et al., J. Org. Chem. 62 5471-5475 (1997))。6のHRFABMSは、m/z 803.4304 [M+Na]⁺で分子イオンを示し、さらに、その構造中のC-18脂肪酸部分を支持した。

【0034】

m/z 753.4173での化合物7の[M+H]⁺は、2の分子イオンよりも2質量単位少なく(755.4331)、したがって、その中に1個の不飽和を伴う16C側鎖の存在を示した。5.34での2H多重項も、オレフィン結合を支持した。2重項がメチルプロトンに由来する1.21で現われ、脂肪酸側鎖に存在する-OH部分が、化合物1及び2での置換と同様に置換されていることを示した。少量の試料により、¹³C NMRスペクトルは、分子中の全ての炭素に関するシグナルをもたらすような情報をもたらさなかった。しかしながら、27.0及び28.1で現われるアシル炭素シグナルにより、二重結合の配置がZと確認された。ウィタナミドのうちのいくつか(1、6~9)は、C-9及びC-10位に二重結合を有することと、生物発生的考慮から、ウィタナミドG中の二重結合が、C-9に由来すると考慮された。

【0035】

23, 24-ジヒドロウィタノリドVI(10)

化合物10は、無色の非晶質粉末として単離され、そのFABMSスペクトルでm/z 785で分子イオンを示した。10における3421、1724及び1663 cm⁻¹でのIR吸収バンドは、分子中に-OH及び飽和ラクトンが存在することを示した。HRFABMSにより、その分子式がC₄₀H₆₅O₁₅ (M+H)⁺ 785.4325; 算出値785.4323)と確認された。0.89、1.01、1.25での1重項及び1.17及び1.15での2重項は、その¹H NMRスペクトルにおいてそれぞれメチル基に割り当てられた。1個のプロトンに関してそれぞれ集積される5.52でのブロード2重項及び4.39及び4.36での2重項はそれぞれ、オレフィン及びアノマープロトンに割り当てられた。4.24での2重項の2重項及び4.0での多重項はそれぞれ、H-22及びH-3に割り当てられた。化合物10及びウィタノリドVI(11)は、同様の¹H NMR化学シフトを示した(Matsumoto, M., et al., Bioorg. Med. Chem. 9 1499-1507 (2001))。10中での2個のメチル2重項の出現は、不飽和ラクトン部分中に二重結合が存在しないことを示していた。11と比較して、10において2個のオレフィン炭素が不存在であり、

178.9でのC=Oが出現していたことから、その分子中の飽和ラクトン環が確認された。アノマー炭素に由来する104.8及び103.1での2個のシグナルは、分子中のジグルコシド部分を支持していた。C-6''プロトン(3.84、3.66)に比較して、C-6'プロトンのダウンフィールドシフト(4.12及び3.76 ppm)は、2個のグルコース成分の1''-6'結合を示した。さらに、ウィタナミドと同様に、C

- 6 (69 . 7) のダウンフィールドシフトによりさらに、グルコシド結合が 1 " 6 ' と確認された。 81 . 9、58 . 1、56 . 1、139 . 1、125 . 5、75 . 1 及び 73 . 6 でのシグナルはそれぞれ、C - 22、C - 14、C - 17、C - 5、C - 6、C - 1 及び C - 3 に割り当てられた。 14 . 2、14 . 4、19 . 9、20 . 5 及び 21 . 2 で現われた他のシグナルはそれぞれ、18、28、19、27 及び 21 メチル炭素に割り当てられた。ジグルコシド単位は、10 のスペクトルデータとウィタノリド 11 ~ 13 のスペクトルデータを比較すると、C - 3 に位置付けられた。ラクトン炭素シグナルを除き、10 中の他の ^{13}C NMR 化学シフトは全て、ウィタノシド VI (11) と同様であった。したがって、10 の構造は、23, 24 - ジヒドロウィタノリド VI (12) と導き出された。ウィタノシド V よりも 2 質量単位ほど高い m/z 784 での分子イオンはさらに、化合物 10 に関して提示された構造を支持した。前記のスペクトルデータから、化合物 10 の構造は、23, 24 - ジヒドロウィタノリド VI と導き出された。

【 0036 】

神経伝達物質であるセロトニンが、ウィタナミド A ~ I (1 ~ 9) の構造における基本骨格を構成していた。したがって、これらの化合物の構造及び活性を比較するために、トリプタミン (14)、5 - メトキシセロトニン (15) 及びセロトニン (16) を購入した。大きな単膜ベシクル (LUV) モデル系を使用することにより、化合物 1 ~ 16 及び市販の抗酸化物質 BHT、BHA 及び TBHQ を脂質過酸化の阻害に関して試験した (Arora, A., et al., Free Radical Biology & Medicine 24 1355 - 1363 (1998))。用量応答試験を全ての化合物に行い、図 4 に報告されている活性濃度を、1 ppm 濃度で評価された市販の抗酸化物質の活性プロファイルと比較した。BHA、BHT 及び TBHQ はそれぞれ、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、脂質過酸化を 80、81 及び 85 % 阻害した (図 4)。ウィタナミド B (2) は、飽和側鎖を含み、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、脂質過酸化を 93 % 阻害した。一方、2 の位置異性体であるウィタナミド C (3) は、79 % の阻害を示した。同様に、ウィタナミド D (4) 及び E (5) で観察された阻害はそれぞれ、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 94 % 及び 81 % であった。その側鎖に 1 個の二重結合を有する化合物 6 及び 7 はそれぞれ、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、85 % 及び 82 % の阻害を示した。同様に、ウィタナミド H (8) は、このアッセイで、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 90 % の阻害を示した。しかしながら、その側鎖に 2 個の二重結合を有するジグルコシドであるウィタナミド A (1) は、脂質過酸化を 98 % 阻害した。一方、トリグルコシドであるウィタナミド I (9) は、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 86 % の阻害を示した (図 4)。このことは、グリコシド単位の数も、これらの化合物の抗酸化活性において重要な役割を果たすことを示していた。

【 0037 】

トリプタミン (14) は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 40 % の阻害を示し、その 5 - メトキシ誘導体である化合物 15 は、脂質過酸化を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、30 % しか阻害しなかった。セロトニン (5 - ヒドロキシトリプタミン) 塩酸塩は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 44 % の阻害を示した。化合物 14 から 16 では、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でのウィタナミドと同様の脂質過酸化のほぼ 100 % の阻害が、試験化合物濃度を 2 倍にした際に観察された。5 - メトキシトリプタミン (15) は、トリプタミン (7) よりも高い活性を示し、このことは、5 - 酸化は、活性を増大させることを示した。セロトニン塩酸塩では、その 5 - メチル誘導体に比較すると、高い阻害が観察され、このことは、5 位の遊離ヒドロキシルは、遊離ラジカル捕捉活性に非常に重要であることを示した。ウィタナミド A ~ I (1 ~ 9) は、市販の抗酸化物質と同等以上で、セロトニンよりもかなり良好な優れた脂質過酸化阻害活性を示した (図 4)。セロトニン核及びヒドロキシ脂肪酸側鎖が、抗酸化活性に顕著に貢献していた。ウィタナミドの中では、不飽和側鎖を有する化合物が、飽和側鎖よりも活性であった。15 及び 17 位にヒドロキシル基を有する化合物 2 及び 4 はそれぞれ、その異性体 3 及び 5 よりも活性であり、このことは、ヒドロキシル基の位置も、その抗酸化活性において重要な役割を果たすことを示していた。この結果は、 Fe^{2+} とのウィタナミドのキレート化の可能性を排除する。それというのも、セロトニン、5 - メトキシセロトニン及び

トリプタミンは、ウィタナミドに比較してかなり高い濃度でしか活性でないためである。

【0038】

本発明において果実から単離されたウィタノリドはさらに、脂質過酸化を阻害した(図5)。W.ソムニフェラ種子から単離される主な化合物の1種であるウィタノシドV(12)は、10ppmで脂質過酸化の82.5%の阻害を示した。一方で、ウィタノシドIV(13)阻害は、100μg/mLで25%であった。ウィタノリドVI(11)は、50ppmで86%の脂質過酸化阻害活性を示し、その23,24-ジヒドロ誘導体(10)は、100ppmで同様の活性を示した(図5)。化合物10のラクトン部分の飽和は、そのデヒドロ誘導体11に比較して、活性を低下させ、このことは、 α -不飽和ラクトンは、ウィタノリドの脂質過酸化能に関して重要であることを示した。化合物11及び13は、12のヒドロキシル化誘導体であった。13のC-27での水酸化は、C-20での水酸化よりも活性を低下させた。これは、ラクトンのC27ヒドロキシルとカルボニル基との水素結合によると思われる。

【0039】

ウィタナミドA~C(1~3)及びウィタノシドV(12)を、シクロオキシゲナーゼ-1(COX-1)及びシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)酵素を阻害する能力に関して試験した(Jayaprakasam, B., et al., Tetrahedron 59 841-849(2003))。これらの化合物は、COX-1又はCOX-2酵素を、100μg/mLで阻害しなかった。これらをさらに、MTTアッセイを使用して、NCI-H460(肺)、HCT-116(結腸)、SF-268(中枢神経系; CNS)及びMCF-7(乳房)ヒト腫瘍細胞系に対する抗増殖活性に関して試験したが(Tian, Q., et al., Nutr. Cancer 40 180-184(2001))、不活性であった。このことは、これらの化合物が、毒性を殆んど若しくは全く有さないことを証明した。

【0040】

セロトニンは、人体での多くの生理学的機能を制御する際に重要な役割を果たしている。その放出は、睡眠の開始、疼痛感受性、血圧制御及び気分の制御における決定因子である。セロトニンレベルの低下、体重増加に到る炭水化物及び一定の食品群の過剰消費(Linnoila, V., et al., J. Clin. Psychiatry 53 46-51(1992))、抑鬱症状、不眠、攻撃性及び慢性頭痛(Wurtman, J., J. Clin. Psychiatry 49 37-39(1998))を生じさせる。セロトニン前駆体である5-ヒドロキシ-L-トリプトファンは、様々なセロトニン関連疾患を治療するために市販薬(OTC)として使用されている(Birdsall, T. C., Altern Med Rev. 3 271-280及びそこに挙げられている参考文献(1998年))。胃でウィタナミドがセロトニンに変化する可能性があり、経口摂取された場合には、その遊離のセロトニンが吸収される可能性がある。したがって、W.ソムニフェラ種から単離されたウィタナミドは、体内でセロトニンレベルを高める可能性を有し、ヒトでのセロトニン不足に関連する様々な疾患に対処するためのサプリメントとして使用することができる。さらに、2種のトリプタミン類似体(スマトリプタン(sumatryptan)及びエリトリプタン(elitryptan))は、偏頭痛関連疾患を治療するために使用されている(Newman, D. J., et al., J. Nat. Prod. 66 1022-1037(2003))。したがって、ウィタナミドは、偏頭痛を治療するための有望な候補物質として考えることができる。ウィタナミドは、有望な抗酸化活性を示したので、これは、アルツハイマー病及びアテローム硬化症を予防するために使用することができる。

【0041】

ウィタナミド1~9は、新規のヒドロキシル置換脂肪酸及びグルコース単位を有する新規のセロトニン誘導体である。ウィタナミド1~9は0.5~1μg/mLで、BHA、BHT及びTBHQと同等か、それ以上、脂質抗酸化を阻害し、このことは、これらが、市販の抗酸化物質よりも良好な抗酸化物質であることを示している。W.コアグレンス(

10

20

30

40

50

coagulance) 及び W. ソムニフェラの種子は、古代からインドでは、牛乳を濃縮するために使用されていた。これらの化合物が、ヒト腫瘍細胞アッセイにおいて、細胞毒性を示さなかったことは、特記すべき重要な事項である。したがって、W. ソムニフェラ種子又はウイタナミドは、ヒトが消費するための新規で安全な抗酸化物質を開発するための有望な候補物質である。さらに、化合物 1 ~ 9 は、W. ソムニフェラ種子を使用して、アルツハイマー病、パーキンソン病及び心臓血管疾患などの様々な加齢関連疾患を治療するための食品サプリメントを開発する際に大きな役割を果たすと思われる。

【実施例】

【0042】

実験手順の一般的な事項

H R F A B 及び F A B (陽イオン方式) 質量スペクトルを、Michigan State University Mass Spectrometry Facility Center にある J E O L M X 1 1 0 質量分析計で測定した。旋光性を、Perkin Elmer Polarimeter 341 (Shelton, CT) で、M E O H 中、20 で測定した。標準的なパルスシーケンスを使用して、 ^1H (50 MHz) 及び ^{13}C (125 MHz) 及び ^2D NMR 実験を I N O V A V A R I A N V R X 500 装置で実施した。化学シフトを、 CD_3OD 中で測定し、(ppm) で表した。H M B C を $J = 8\text{ Hz}$ のために最適化した。I R スペクトルを Mattson Galaxy Series FTIR 300 で WinFIR ST ソフトウェア (Thermo Nicolet, Madison, WI) 分光計を使用して記録した。単離及び精製のために使用された溶剤は全て、ACS 級である。M P L C のために使用されたシリカゲルは、Merck Silica gel 60 (粒度 $35 \sim 70\text{ }\mu\text{m}$) であった。Si ゲル P T L C プレート (20×20 、 $500\text{ }\mu\text{m}$) を Analtec, Inc. (Newark, DE) から購入した。再生分取 H P L C (Japan Analytical Industry Co. LC-20 モデル) を、化合物を分離するための J A I G E L - O D S - C₁₈ カラムと共に使用した。陽性対照のブチル化ヒドロキシアニソール (B H A)、ブチル化ヒドロキシトルエン (B H T) 及び t -ブチルヒドロキノン 9 (T B H Q)、セロトニン、5-メトキシセロトニン及びトリプタミンを Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) から購入した。脂質の 1-ステアロイル 2-リノレオイル sn-グリセロール 3-ホスホコリン (S L P C) を Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) から購入した。蛍光プローブの 3-[p-(6-フェニル)-1,3,5-ヘキサトリエニル]-フェニルプロピオン酸を、Molecular Probes (Eugene, OR) から購入し、R-及び S-メトキシ-(トリフルオロメチル)フェニルアセチル (M T P A) 塩化物は、Sigma-Aldrich Co. から購入した。

【0043】

植物原料

植物ウイタニアソムニフェラを、ミシガン州立大学にある Bioactive Natural Products and Phytochemical Laboratory の温室で育成した。植物を、12時間の光周期、75華氏温度で、ローム性砂及びバクト (bact o) ミックスからなる 1:1 混合物中、6" プラスチック鉢内で育成した。植物に水を与え、20:20:20 (N:P:K) を使用して毎日、肥料を与えた。十分に熟した種子を集め、室温で乾燥させ、直ちに抽出した。

【0044】

抽出及び単離

W. ソムニフェラの乾燥させ、粉碎した果実 (100 g) を n -ヘキサン ($3 \times 500\text{ mL}$)、E t O A c ($3 \times 500\text{ mL}$)、M e O H ($5 \times 500\text{ mL}$) 及びアンモニア M e O H ($3 \times 500\text{ mL}$) で順次抽出した。減圧下に溶剤を蒸発させ、 n -ヘキサン (8 g)、E t O A c (2 g)、M e O H (8 g) 及びアンモニア M e O H (2 g) の粗製抽出物を得た。M e O H 抽出物 (7 g) を n -ヘキサン ($5 \times 150\text{ mL}$) を用いて脱脂し

(1.5 g)、70%の CHCl_3 から80%の MeOH への勾配条件下に、シリカゲル中圧液体クロマトグラフィー(MPLC)により分画した。70% CHCl_3 溶離液を、それぞれ40 mlの10個のフラクションにおいて収集し、TLC上で同様に、貯留して、濃縮すると、フラクションI(300 mg)が得られた。 CHCl_3 : MeOH (1:1)溶離から得られた同様のフラクション(8個のフラクション、それぞれ50 mL)を合わせて、濃縮すると、フラクションII(100 mg)が得られた。 CHCl_3 : MeOH (40:60)溶離液から、15個のフラクション(それぞれ50 mL)が得られ、これらは同様に、貯留し、蒸発させると、フラクションIII(2 g)が得られた。 CHCl_3 : MeOH (30:70溶離)からの6種の同様のフラクション(それぞれ45 mL)の濃縮により、フラクションIV(1.8 g)が得られた。80% MeOH 溶離液を貯留し、蒸発させると、V(200 mg)が得られた。

10

【0045】

TLCにより示されたように、フラクションI及びIIは主に、脂肪酸を含有した。JAIGEL-ODS- C_{18} カラム及び移動相として3 mL/分の MeOH : H_2O を使用する分取HPLCにより、フラクションIII(1.8 g)を精製した。集められたフラクションは、A(15~30分、500 mg)、B(31~41分、200 mg)、C(42~56分、500 mg)、D(58~70分、200 mg)及びE(71~95分、50 mg)であった。 CH_3CN : H_2O (62.5:37.5、v/v)を使用する分取HPLCにより、フラクションCをさらに精製し、純粋な化合物1(81.95分、62 mg)、2(92.0分、71 mg)及びフラクション(104分、35 mg)を得た。 CH_3CN : H_2O (1:1、v/v)を使用する分取HPLCにより、化合物1及び2を再び精製して、純粋な化合物1(35分、50 mg)及び2(38.0、70 mg)を得た。 EtOAc : MeOH (9:1、v/v)を使用する分取TLCで、104分でのフラクションをさらに精製して、同じ移動相で3回展開すると、純粋な化合物3(R_f = 0.5、12 mg)が得られた。 MeOH : H_2O (76:24、v/v)を使用するHPLCにより、フラクションDを精製すると、純粋な化合物12(67.3分、150 mg)が得られた。 MeOH : H_2O (75:25)を使用するHPLCにより、フラクションEを精製すると、3種のフラクションF(71分、14 mg)、G(101分、5 mg)、H(112分、4.0 mg)が得られた。

20

【0046】

分取TLC(CHCl_3 : MeOH 、4:1)で、フラクションGを精製すると、化合物4(R_f = 0.6、2.5 mg)が得られた。移動相で CHCl_3 : MeOH (5:1)を使用するPTLCで、フラクションF及びHを精製すると、5(R_f = 0.65、8 mg)及び6(R_f = 0.58、3.0 mg)が得られた。フラクションIIを、 CH_3CN : H_2O (34:66、v/v)を使用するHPLCに掛けると、5種のフラクションfr.1(37.0分、38.1 mg)、fr.2(45~70分、68.8 mg)、fr.3(84.4分、19.8 mg)及びfr.4(94.9分、11.4 mg)が得られた。

30

【0047】

移動相(CHCl_3 : MeOH 、1:1、v/v)を使用する分取TLCにより、fr.1を精製すると、純粋なウィタノリド13(R_f = 0.40、7.0 mg)が得られた。PTLC(CHCl_3 : MeOH 、75:25、v/v)によりfr.4を繰り返し精製すると、純粋な化合物8(R_f = 0.72、2 mg)が得られた。同様に、PTLC(CHCl_3 : MeOH 、70:30、v/v)によりfr.3を精製すると、化合物7(R_f = 0.61、1.0 mg)及び9(R_f = 0.8、0.7 mg)が得られた。PTLC(CHCl_3 : MeOH 、1:1、v/v)によるfr.2の精製により、 R_f = 0.5(25.0 mg)のバンドが得られ、移動相として CH_3CN : H_2O (33:67)を使用する分取HPLCによりさらに精製すると、ウィタノリド10(62.4分、6.0 mg)及び11(70.8分、4.0 mg)が得られた。

40

【0048】

50

ウィタナミド A (1) 非晶質粉末
【化 2 3】

$[\alpha]_D = -35^\circ$

(C 0.0125, MeOH), IR ν_{\max} (KBr) 3413 (-OH), 2926, 2854, 1633 (-CONH), 1458, 1071, 1033, 626. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.15 (1H, dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz), 6.99 (1H, s, H-2), 6.92 (1H, dd, $J = 2.5, 0.5$ Hz, H-4), 6.66 (1H, ddd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, H-6), 5.31 (4H, m, H-6'', 7'', 9'', 10''), 4.38 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 4.30 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 4.10 (1H, dd, $J = 11.5, 1.0$ Hz, H-6'b), 3.85 (1H, dd, $J = 12.0, 2.5$ Hz, H-6''b), 3.79 (1H, m, H-17'''), 3.77 (1H, dd, $J = 11.5, 5.0$ Hz, H-6'a), 3.65 (1H, dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, H-6''a), 3.42 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 3.40 (1H, m, H-5'), 3.39 (2H, m, H-4', H-4''), 3.27-3.38 (2H, m, H-5'', H-3'', H-3'), 3.20 (1H, d, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2''), 3.15 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2'), 2.84 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10), 2.75 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-8'''), 2.12 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2'''), 2.04 (4H, m, H-5'', 11''), 1.54 (2H, m, H-3'''), 1.42 (2H, m, H-4'''), 1.32 (2H, m, H-16'''), 1.27 (8H, br. s, H-12'''-H-15'''), 1.19 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-18'''). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 176.2 (C-1'''), 151.0 (C-5), 133.0 (C-8), 130.9 (C-10'''), 130.8 (C-7'''), 129.4 (C-9), 129.2 (C-9'''), 129.0 (C-6'''), 124.2 (C-2), 112.6 (C-7), 112.5 (C-3), 112.4 (C-6), 104.7 (C-1''), 104.0 (C-1'), 103.5 (C-4), 77.9 (C-3', 3'', 5''), 77.7 (C-17'''), 76.8 (C-5'), 75.2 (C-2''), 75.0 (C-2'), 71.6 (C-4''), 71.4 (C-4'), 69.7 (C-6'), 62.7 (C-6''), 41.2 (C-11), 37.3 (C-16'''), 37.2 (C-2'''), 30.6-30.1 (C-12'''-15'''), 30.0 (C-4'''), 28.2 (C-11'''), 28.1 (C-5'''), 27.0 (C-3'''), 26.5 (C-8'''), 26.3 (C-10), 22.1 (C-18'''). HRFABMS 779.4329 (calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{63}\text{N}_2\text{O}_{13}$ (M+H) $^+$, 779.4330). FABMS (m/z) 779 [M+H] $^+$, 778 [M] $^+$, 617, 455, 437, 175, 160, 159, 146.

【 0 0 4 9 】

ウィタナミド B (2) 非晶質粉末

10

20

30

40

【化 2 4】

[α]_D = -34°

(C 0.0125, MeOH), IR ν_{\max} (KBr) 3372 (-OH), 2924, 2853, 1632 (-CONH), 1463, 1371, 1071, 1031, 631. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.15 (1H, dd, J = 8.5, 0.5 Hz, H-7), 7.0 (1H, s, H-2), 6.94 (1H, dd, J = 2.5, 0.5 Hz, H-4), 6.66 (1H, dd, J = 9.0, 2.5 Hz, H-6), 4.40 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1''), 4.32 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1'), 4.11 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6'b), 3.87 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6''b), 3.79 (1H, m, H-15'''), 3.78 (1H, dd, J = 12.0, 5.5 Hz, H-6'a), 3.67 (1H, dd, J = 12.0, 5.5 Hz, H-6''a), 3.44 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-11), 3.41 (2H, m, H-4'', 5'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.25-3.38 (2H, m, H-5'', H-3'', H-3'), 3.24 (1H, dd, J = 9.0, 8.0 Hz, H-2''), 3.17 (1H, dd, J = 9.0, 8.0 Hz, H-2'), 2.85 (2H, t, J = 8.0 Hz, H-10), 2.13 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-2'''), 1.55 (2H, m, H-3'''), 1.39 (4H, m, H-4''', H-14'''), 1.26 (18H, br. s, H-5'''-H-13'''), 1.20 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-16'''); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 176.2 (C-1'''), 151.0 (C-5), 133.0 (C-8), 129.4 (C-9), 124.2 (C-2), 112.6 (C-7), 112.4 (C-3), 112.3 (C-6), 104.7 (C-1''), 103.9 (C-1'), 103.5 (C-4), 77.9 (3'', 5''), 77.8 (C-3'), 77.7 (C-15'''), 76.8 (C-5'), 75.2 (C-2''), 75.0 (C-2'), 71.5 (C-4''), 71.4 (C-4'), 69.7 (C-6'), 62.7 (C-6''), 41.2 (C-11), 37.6 (C-14'''), 37.2 (C-2'''), 30.8-30.2 (C-4'''-13'''), 27.0 (C-3'''), 26.3 (C-10), 22.0 (C-16'''). HRFABMS 755.4331 (calcd for C₃₈H₆₃N₂O₁₃ (M+H)⁺, 755.4330). FABMS (m/z) 777 [M+Na]⁺, 755 [M+H]⁺, 754 [M]⁺, 593, 431, 413, 396, 160, 146.

10

20

30

【 0 0 5 0 】

ウィタナミド C (3) 非晶質粉末

【化 2 5】

[α]_D = -34°

(C 0.01, MeOH), IR ν_{\max} (KBr) 3422 (-OH), 2924, 2853, 1633 (-CONH), 1459, 1071, 1032, 631. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.15 (1H, dd, J = 8.5, 0.5 Hz, H-7), 6.99 (1H, s, H-2), 6.92 (1H, dd, J = 2.0, 0.5 Hz, H-4), 6.65 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 4.40 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1''), 4.30 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1'), 4.10 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6'b), 3.86 (1H, dd, J = 12.0, 2.5 Hz, H-6''b), 3.79 (1H, dd, J = 12.0, 6.0 Hz, H-6'a), 3.66 (1H, dd, J = 12.0, 5.5 Hz, H-6''a), 3.63 (1H, m, H-14'''), 3.44 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-11), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.39 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-5'), 3.25-3.37 (4H, m, H-5'', 4'', 3', 4'), 3.20 (1H, dd, J = 9.0, 7.5 Hz, H-2''), 3.16 (1H, dd, J = 9.0, 7.5 Hz, H-2'), 2.85 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-10), 2.14 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-2'''), 1.56 (4H, m, H-3''', 15'''), 1.52 (2H, m, H-13'''), 1.39 (4H, m, H-4''' & H-14'''), 1.27 (18H, br. s, H-4'''-H-12'''), 0.91 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-16'''); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 176.3 (C-1'''), 151.1 (C-5), 133.1 (C-8), 129.5 (C-9), 124.2 (C-2), 112.6 (C-7), 112.5 (C-3), 112.4 (C-6), 104.9 (C-1''), 103.6 (C-1'), 103.5 (C-4), 82.0 (C-14'''), 78.1 (C-5''), 78.0 (C-3', 3''), 77.0 (C-5'), 75.3 (C-2''), 75.2 (C-2'), 71.7 (C-4''), 71.6 (C-4'), 69.9 (C-6'), 62.8 (C-6''), 41.2 (C-11), 37.2 (C-2'''), 34.5 (C-13'''), 31.0-28.6 (C-4'''-12'''), 27.0 (C-3'''), 26.3 (C-15'''), 26.0 (C-10), 10.1 (C-16'''). HRFABMS 755.4331 (calcd for C₃₈H₆₃N₂O₁₃ (M+H)⁺, 755.4330). FABMS (m/z) 777 [M+Na]⁺, 755 [M+H]⁺, 754 [M]⁺, 431, 413, 396, 160, 159, 146.

【 0 0 5 1】

ウイタナミド D (4) 非晶質粉末

【化 2 6】

IR ν_{\max}

(KBr) 3402 (-OH), 2923, 2852, 1636 (-CONH), 1464, 1381, 1071, 1040, 630. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.14 (1H, dd, $J = 9.0, 0.5$ Hz, H-7), 6.99 (1H, s, H-2), 6.93 (1H, dd, $J = 2.5, 0.5$ Hz, H-4), 6.65 (1H, dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, H-6), 4.39 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1''), 4.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 4.10 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, H-6'b), 3.86 (1H, dd, $J = 12.0, 2.5$ Hz, H-6''b), 3.79 (1H, m, H-17'''), 3.79 (1H, dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, H-6'a), 3.66 (1H, dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, H-6''a), 3.44 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-11), 3.41 (2H, m, H-4'', 5'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.25-3.36 (4H, m, H-3', 3'', 5', 5''), 3.20 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2''), 3.15 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2'), 2.86 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10), 2.14 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2'''), 1.57 (2H, m, H-3'''), 1.40 (2H, m, H-16'''), 1.28 (24H, br. s, H-4'''-H-15'''), 1.21 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-18'''); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 176.3 (C-1'''), 151.1 (C-5), 133.1 (C-8), 129.5 (C-9), 124.2 (C-2), 112.6 (C-7), 112.5 (C-3), 112.4 (C-6), 104.8 (C-1''), 104.0 (C-1'), 103.5 (C-4), 78.0 (C-3', 3'', 5''), 77.8 (C-17'''), 77.0 (C-5'), 75.3 (C-2''), 75.1 (C-2'), 71.6 (C-4'), 71.5 (C-4''), 69.8 (C-6'), 62.8 (C-6''), 41.2 (C-11), 37.8 (C-16'''), 37.2 (C-2'''), 30.9-30.2 (C-4'''-15'''), 27.0 (C-3'''), 26.3 (C-10), 22.1 (C-18'''). HRFABMS 805.4462 (calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{Na}$, 805.4463). FABMS (m/z) 805 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 783 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 643, 459, 441, 371, 363, 347, 160, 159.

10

20

30

【 0 0 5 2】

ウイタナミド E (5) 非晶質粉末

【化 2 7】

¹H NMR

(500 MHz, CD₃OD) δ 7.15 (1H, dd, *J* = 8.5 Hz, H-7), 7.0 (1H, s, H-2), 6.93 (1H, dd, 2.0, 0.5 Hz, H-4), 6.65 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 4.40 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1''), 4.30 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 4.10 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H-6'b), 3.86 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.5 Hz, H-6''b), 3.78 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, H-6'a), 3.66 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.5 Hz, H-6''a), 3.63 (1H, t, *J* = 6.0, H-14'''), 3.44 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-11), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.39 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-5'), 3.25-3.37 (4H, m, H-5'', 4'', 3', 4'), 3.20 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, H-2''), 3.16 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, H-2'), 2.85 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-10), 2.14 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2'''), 1.56 (4H, m, H-3''', 17'''), 1.52 (2H, m, H-15'''), 1.27 (22H, br. s, H-4'''-H-14'''), 0.91 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-18'''). HRFABMS 783.4645 (calcd for C₄₀H₆₇O₁₃N₂ 783.4644). FABMS (*m/z*) 805 [M+Na]⁺, 783 [M+H]⁺, 765, 621, 459, 441, 282, 202, 175, 160, 159, 146.

10

20

【0 0 5 3】

ウィタナミド F (6) 非晶質粉末

【化 2 8】

IR ν_{\max}

(KBr) 3402 (-OH), 2926, 2853, 1635 (-CONH), 1456, 1368, 1069, 1036, 615. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.14 (1H, dd, $J = 8.5, 0.5$ Hz, H-7), 6.99 (1H, s, H-2), 6.92 (1H, dd, $J = 2.5, 0.5$ Hz, H-4), 6.65 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, H-6), 5.33 (2H, m, H-9^{'''}, 10^{'''}), 4.39 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1^{''}), 4.30 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.09 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, H-6'^b), 3.86 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, H-6''^b), 3.78 (1H, dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, H-6'^a), 3.66 (1H, dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, H-6''^a), 3.62 (1H, t, $J = 6.0$, H-16^{'''}), 3.44 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 3.41 (2H, m, H-4'', 5'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.25-3.36 (4H, m, H-3', 3'', 5', 5''), 3.20 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2''), 3.15 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2'), 2.85 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10), 2.14 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2^{'''}), 2.02 (4H, m, H-8^{'''}, 11^{'''}), 1.55 (8H, m, H-3^{'''}, 16^{'''}, 7^{'''}, 12^{'''}), 1.28 (24H, br. s, H-4^{'''}-6^{'''}, H-13^{'''}-15^{'''}), 0.91 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18^{'''}). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 176.3 (C-1^{'''}), 151.2 (C-5), 133.1 (C-8), 130.9 (C-10^{'''}), 130.8 (C-9^{'''}), 129.5 (C-9), 124.2 (C-2), 112.6 (C-7), 112.5 (C-3), 112.4 (C-6), 104.9 (C-1^{''}), 103.6 (C-1'), 103.5 (C-4), 82.0 (C-16^{'''}), 78.0 (C-3', 3'', 5''), 77.0 (C-5'), 75.3 (C-2''), 75.1 (C-2'), 71.7 (C-4''), 71.6 (C-4'), 69.9 (C-6'), 62.8 (C-6''), 41.2 (C-11), 37.2 (C-17^{'''}), 37.2 (C-2^{'''}), 30.8-30.1 (C-5^{'''}-7^{'''}, C-12^{'''}-C15^{'''}), 30.2 (C-4^{'''}), 28.2 (C-11^{'''}), 28.1 (C-8^{'''}), 27.0 (C-3^{'''}), 26.5 (C-8^{'''}), 26.3 (C-10), 10.2 (C-18^{'''}). HRFABMS 803.4304 (calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{O}_{13}\text{N}_2\text{Na}$, 803.4306). FABMS (m/z) 803 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 781 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 641, 619, 457, 439, 393, 347, 160, 159, 146.

【 0 0 5 4】

ウイタナミド G (7) 非晶質粉末

【化 2 9】

 ^1H - NMR

(500 MHz, CD_3OD) δ 7.15 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-7), 7.0 (1H, s, H-2), 6.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-4), 6.65 (1H, dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, H-6), 5.34 (2H, m, H-9^{'''}, 10^{'''}), 4.39 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1^{''}), 4.31 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.10 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, H-6'b), 3.85 (1H, dd, $J = 12.0, 2.5$ Hz, H-6''b), 3.79 (1H, m, H-15^{'''}), 3.78 (1H, dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz, H-6'a), 3.66 (1H, dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz, H-6''a) 3.44 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 3.41 (2H, m, H-4'', 5'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.25-3.38 (4H, m, H-5'', H-3'', H-3'), 3.24 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2''), 3.16 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2'), 2.85 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10), 2.14 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2^{'''}), 1.55 (2H, m, H-3^{'''}, H-14^{'''}), 2.03 (4H, m, H-2^{'''}), 1.39 (2H, m, H-3^{'''}), 1.28 (14H, br. s, H-5^{'''}-H-13^{'''}), 1.21 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16^{'''}). HRFABMS 753.4173 (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{O}_{13}\text{N}_2$, 753.4174). FABMS (m/z) 775 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 753 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 596, 155, 114.

10

20

【 0 0 5 5 】

ウィタナミドH (8) 非晶質粉末

【化 3 0】

¹H NMR

(500 MHz, CD₃OD) δ 7.14 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-7), 6.99 (1H, s, H-2), 6.92 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-4), 6.65 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, H-6), 5.34 (8H, m, H-6^{'''}, 7^{'''}, 9^{'''}, 10^{'''}, 11^{'''}, 12^{'''}, 14^{'''}, 15^{'''}), 4.33 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1^{''}), 4.27 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 4.10 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H-6'^b), 3.85 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.5 Hz, H-6''^b), 3.79 (1H, m, H-15^{'''}), 3.78 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, H-6'a), 3.66 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, H-6'' a), 3.44 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-11), 3.41 (2H, m, H-4'', 5'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.25-3.38 (4H, m, H-5'', H-3'', H-3'), 3.24 (1H, dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, H-2''), 3.16 (1H, dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, H-2'), 2.85 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-10), 2.82 (6H, m, H-8^{'''}, 11^{'''}, 14^{'''}), 2.14 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2^{'''}), 2.07 (2H, m, 5^{'''}), 1.55 (2H, m, H-3^{'''}), 1.28 (2H, br. s, H-4^{'''}), 1.24 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-6^{'''}). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 176.3 (C-1^{'''}), 151.2 (C-5), 133.2 (C-8), 132.6 (C-9^{'''}), 132.2 (C-6^{'''}), 131.4 (C-7^{'''}, 10^{'''}), 130.1 (C-15^{'''}), 129.5 (C-9), 128.7 (C-12^{'''}, 13^{'''}), 128.5 (C-6^{'''}, 15^{'''}), 124.2 (C-2), 112.6 (C-7), 112.5 (C-3), 112.4 (C-6), 104.9 (C-1^{''}), 100.9 (C-1'), 103.5 (C-4), 78.0 (C-3', 3'', 5''), 77.7 (C-17^{'''}), 76.8 (C-5'), 75.0 (C-2''), 74.9 (C-2'), 71.6 (C-4''), 71.3 (C-4'), 69.6 (C-6'), 62.8 (C-6''), 41.2 (C-11), 37.2 (C-2^{'''}), 30.7 (C-4^{'''}), 28.2 (C-5^{'''}), 27.0 (C-3^{'''}), 26.6 (C-8^{'''}, 11^{'''}, 12^{'''}), 26.3 (C-10), 21.9 (C-18^{'''}). HRFABMS 775.4013 (calcd for C₄₀H₅₉O₁₃N₂, 775.4017). FABMS (*m/z*) 799 [M+Na]⁺, 775 [M+H]⁺, 591, 435, 411, 160, 159, 146.

10

20

30

【 0 0 5 6】

ウイタナミド I (9) 非晶質粉末

【化 3 1】

¹H NMR

(500 MHz, CD₃OD) δ 7.14 (1H, d, *J* = 8.5, 0.5 Hz, H-7), 6.99 (1H, s, H-2), 6.93 (1H, d, 2.5 Hz, H-4), 6.65 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 5.33 (4H, m, H-6^{'''}, 7^{'''}, 9^{'''}, 10^{'''}), 4.39 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1^{''}), 4.36 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1^{'''}), 4.32 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 4.15 (1H, bd, *J* = 12.0 Hz, H-6^{''b}), 4.09 (1H, br. d, *J* = 12.0 Hz, H-6^{'b}), 3.86 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H-6^{'''b}), 3.79 (1H, m, H-15^{'''}), 3.78 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.5 Hz, H-6^{'a}), 3.75 (1H, dd, *J* = 11.0, 6.0 Hz, H-6^{'a}), 3.66 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, H-6^{'''a}), 3.44 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-11), 3.41 (3H, m, H-4^{''}, 4^{'''}, 5'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.25-3.38 (5H, m, H-5^{''}, 5^{'''}, 3^{'''}, 3^{''}, 3'), 3.24 (2H, dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, H-2^{''}, 2^{'''}), 3.16 (1H, dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, H-2'), 2.85 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-10), 2.77 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-8^{'''}), 2.15 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2^{'''}), 1.28 (10H, br s, H-5^{'''}-H-13^{'''}), 2.04 (4H, m, H-5^{'''}, 11^{'''}), 1.56 (2H, m, H-3^{'''}), 1.21 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-6^{'''}). HRFABMS 941.4857 (calcd for C₄₆H₇₃O₁₈N₂, 941.4859). FABMS (*m/z*) 963 [M+Na]⁺, 941 [M+H]⁺, 617, 455, 437, 316, 160, 159, 146.

10

20

【 0 0 5 7】

2 3 , 2 4 - ジヒドロウィタノリド V I (1 0) 無色、非晶質粉末

【化 3 2】

IR ν_{\max} (KBr) 3421 (-OH), 2936, 1724, 1663, 1460, 1384, 1073, 1043. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 5.52 (1H, br d, $J = 5.0$ Hz, H-6), 4.39 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1''), 4.24 (1H, dd, $J = 11.5, 2.5$ Hz, H-22), 4.36 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 4.12 (1H, dd, $J = 11.5, 2.5$ Hz, H-6'b), 4.0 (1H, m, H-3), 3.86 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, H-6''b), 3.80 (1H, m, H-1), 3.76 (1H, dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, H-6'a), 3.66 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-6''a), 3.41 (3H, m, H-4'', 5', H-11), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.25-3.38 (3H, m, H-5'', H-3'', H-3'), 3.24 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2''), 3.16 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2'), 1.24 (3H, s, Me-28), 1.17 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, Me-27), 1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, Me-27), 1.01 (3H, s, Me-19), 0.89 (3H, s, Me-18). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 178.9 (C-26), 139.15 (C-5), 125.5 (C-6), 104.8 (C-1''), 103.1 (C-1'), 81.9 (C-22), 78.0 (C-3', 3''), 77.9 (C-5''), 77.0 (C-5'), 76.5 (C-20), 75.5 (C-2''), 75.2 (C-2'), 75.1 (C-1), 73.6 (C-3), 71.7 (C-4''), 71.6 (C-4'0), 69.7 (C-6'), 62.8 (C-6''), 58.1 (C-14), 56.1 (C-17), 44.0 (C-26), 42.7 (C-13), 42.5 (C-10), 41.4 (C-9), 41.1 (C-12), 39.2 (C-4), 37.8 (C-2), 32.8 (C-25), 32.7 (C-23), 32.6 (C-7), 32.0 (C-8), 25.0 (C-15), 23.0 (C-16), 21.2 (C-21), 20.5 (C-27), 19.9 (C-19), 14.4 (C-28), 14.2 (C-18). HRFABMS 785.4325 (calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{O}_{15}$, 785.4323). FABMS m/z 807 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 785. 623, 605, 587, 443, 425, 407, 255.

10

20

30

【0058】

化合物 11 ~ 13

化合物 11 ~ 13 の構造を、 ^1H 及び ^{13}C NMR データにより明らかにし、スペクトルデータと刊行結果とを比較することにより、その同定を行った (Jayaprakasam, B., et al., Tetrahedron 59 841-849 (2003) 及び Matsuda, M., et al., Bioorg. Med. Chem. 9 1499-1507 (2001)).

【0059】

化合物 1 の R - 及び S - MTPA エステルの調製

化合物 1 (1.5 mg) 及び R - (-) のメトキシトリフルオロフェニルアセチル塩化物 (R - MTPA) を含むピリジン中の混合物をジメチルアミノピリジン (DMAP) と共に (5 時間) 室温で攪拌した。溶剤を蒸発させ、得られた残留物を CHCl_3 : MeOH (9 : 1, v/v) を使用する PTL C で精製すると、R - MTPA エステル (1.0 mg) が得られた。同様に、化合物 1 (1.2 mg) を、S - (+) - メトキシトリフルオロフェニルアセチル塩化物で処理し、生じた生成物を精製すると、S - MTPA エステル (0.9 mg) が得られた。

【0060】

抗酸化アッセイ

40

50

公表されている手順 (Arora, A., et al., Free Radical Biology & Medicine 24 1355-1363 (1998)) に従い、大きな単膜ベシクル (リポソーム懸濁液) を使用して、化合物 1 ~ 16 を脂質過酸化の阻害に関して試験した。リン脂質 1 - ステアロイル - 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (SLPC) 及び蛍光試料 [3 - [p - (6 - フェニル) - 1, 3, 5 - ヘキサトリエニルフェニルプロピオン酸 (DPH - PA) とを混合することにより、リポソーム懸濁液を調製した。最終アッセイ容量は 2 mL であり、HEPES (100 μ L)、1 M の NaCl (200 μ L)、N₂ - スパージされた水 (1.64 mL)、試験試料又は DMSO (20 μ L) 及びリポソーム懸濁液 (20 μ L) から構成された。FeCl₂ · 4H₂O (0.5 mM) 20 μ L を加えることにより、過酸化を開始した。Turner Model 450 Digital 蛍光測定器を使用して、0、1、3 分及び 3 分ごとに 21 分まで、蛍光を監視した。一定期間にわたる (21 分) 蛍光強度の低下は、過酸化速度を示した。脂質過酸化のパーセンテージを、DMSO 溶剤対照に対して算出した。試料のストック溶液を 100 μ g/mL で調製し、アッセイのためにさらに希釈した。

10

【0061】

薬剤組成物

薬剤組成物において、ウィタナミド又はウィタノリドは、1 ミリリットル又は 1 グラム当たり 1 から 1000 マイクログラムの用量で阻害性を有する。好ましい一実施形態では、患者を治療するために、1 種又は複数のウィタナミド又はウィタノリドを薬学的に許容できる担体中に阻害用量を含有させて患者に与えられる。このように、慣用の混合、顆粒化、コーティング、懸濁及びカプセル封入法などの当技術分野でよく知られている方法により、ウィタナミド又はウィタノリドを薬学的担体物質と共に処理して、経口又は直腸投与のための慣用の製剤にする。したがって、1 種又は複数のアントラキノンと固体薬学的担体とを組合せ；任意に、生じた混合物を顆粒化し；この混合物又は顆粒物を望ましい場合には、及び/又は任意に適切な助剤を加えた後に処理して、錠剤又は糖衣剤核の形態にすることにより、経口投与のためのウィタノリド又はウィタナミド製剤を得ることができる。

20

【0062】

固体製剤のための適切な薬学的担体は特に、糖 (例えば、ラクトース、サッカロース、マンニトール又はソルビトール)、セルロース製剤及び/又はリン酸カルシウム (例えば、リン酸三カルシウム又はリン酸水素カルシウム) などの充填剤；さらに、使用場合にはデンプンペースト (例えば、トウモロコシ、小麦、米又は馬鈴薯デンプン)、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及び/又はポリビニルピロリドン、一部遊離の官能基を有するポリアクリレート若しくはポリメタクリレートのエステルなどの結合剤；並びに/或いは、必要な場合には、前記のデンプン、さらにカルボキシメチルデンプン、架橋ポリビニルピロリドン、寒天又はアルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの発泡剤である。助剤は主に、流量調節剤及び滑剤、例えば、ケイ酸、タルク、ステアリン酸又はステアリン酸マグネシウム若しくはステアリン酸カルシウムなどのその塩である。糖衣丸核は、任意に胃酸に対して耐性を有する適切なコーティングを備えていて、この際、特に、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン及び/又は二酸化チタンを任意に含有する濃縮糖溶液、水性溶剤中のラッカー溶液或いは、胃液に対して耐性を有するコーティングを製造するためには、フタル酸エステル又はトリアセチンなどの適切な軟化剤を有するか、有しない、部分的に遊離な官能基を有するポリアクリレート若しくはポリメタクリレートのエステルの溶液又はフタル酸アセチルセルロース若しくはフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの適切なセルロース調整物の溶液が使用される。例えば、活性成分の様々な用量を特定又は表示するために、染料又は顔料を錠剤又は糖衣丸コーティングに加えることもできる。

30

40

【0063】

50

経口投与することができる１種又は複数のウィタノリド又はウィタナミド製剤はさらに、硬質ゼラチンカプセル、並びに、ゼラチン製の硬質若しくは軟質密封カプセル及び必要な場合には、グリセリン又はソルビトールなどの軟化剤を含有する。硬質ゼラチンカプセルは、１種又は複数のウィタノリドを、顆粒の形態で、例えば、トウモロコシデンプンなどの充填剤、任意に顆粒化された小麦デンプン、タルク、ステアリン酸マグネシウム又はコロイドケイ酸などの結合剤又は潤滑剤、及び任意に安定剤との混合物として含有することができる。密封カプセルでは、１種又は複数のウィタノリドは、粉末又は顆粒の形態であるか；好ましくは、適切な溶剤中の懸濁液の形態で存在するので、懸濁液を安定化するために、例えば、モノステアリン酸グリセリンを加えることができる。

【００６４】

10

経口投与するための他のウィタノリド又はウィタナミド製剤は例えば、通常の方法で調製される水性懸濁液であり、この懸濁液は、１種又は複数の化合物を、懸濁された形態で１回用量に十分な濃度で含有する。水性懸濁液は、最小量の安定剤及び／又は着香物質を含有し、例えば、サッカリンナトリウム又はシロップなどの甘味料は、一定量の糖及び／又はソルビトール又は同様の物質を含有する。さらに、シェーキを調製するためには、例えば、濃縮物又は濃縮懸濁液が適している。このような濃縮物も、１回用量にパッケージングすることができる。

【００６５】

直腸投与のための適切なウィタノリド又はウィタナミド製剤は、例えば、１種又は複数のウィタノリドと座薬ファンデーション物質との混合物からなる座薬である。このような物質は特に好ましくは、天然若しくは合成のトリグリセリド混合物である。さらに、ファウンデーション物質中に１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドを含む懸濁液からなるゼラチン直腸カプセルが適している。適切なファウンデーション物質は例えば、高飽和又は、特に好ましくは中飽和脂肪酸の液体トリグリセリドである。

20

【００６６】

同様に、微細に粉碎された、好ましくは、粒度中央値５μm未満を有する１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドを、デンプンと、特に好ましくはトウモロコシデンプン又は小麦デンプンと、または例えば、馬鈴薯デンプン又は米デンプンと混合された形態で含有する製剤が、特に好ましい。好ましくは、大量の成分の場合には、必要ならば冷却しながら、プロペラ様の薄刃攪拌装置を備えた高速ミキサー中で、例えば３から１０分間の混合時間で簡単に混合することにより、これを製造する。この混合プロセスでは、粒子のサイズを継続的に低下させながら、１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドの粒子を均一にデンプン粒子の上に堆積させる。前記の混合物を、慣用の、例えば前記の助剤と共に、固体用量単位に処理する。即ち、例えば圧縮して、錠剤又は糖衣丸の形態にするか、カプセルに充填する。しかしながらこれらは、そのまま、又は助剤、例えば、高級脂肪酸とのポリオキシエチレンソルビタンのエステル又は硫酸ラウリルナトリウムなどの薬学的に許容できる湿潤剤及び分散剤及び／又は着香物質を加えた後に、水性懸濁液を調製するための、例えば約５から２０倍量の水を伴う濃縮物として使用することもできる。ウィタノリド又はウィタナミド／デンプン混合物と界面活性物質又は他の助剤とを組み合わせる代わりに、これらの物質を、懸濁液を調製するために使用される水に加えることもできる。１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミド／デンプン混合物及び場合により助剤を含む懸濁液を製造するための濃縮物を、必要ならば気密及び防湿に、１回用量でパッケージングすることもできる。

30

40

【００６７】

加えて、１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドを、患者に腹腔内、鼻腔内、皮下又は静脈内投与することができる。通常、腹腔内、鼻腔内、皮下又は静脈内投与では、可溶化剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定剤及び防腐剤などの慣用の添加剤と共に、植物性又は他の同様のオイル、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステル又はプロピレングリコールなどの水性又は非水性溶剤中に溶解、懸濁又は乳化させることにより、１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドを与える。好ましくは、１種又は複数のウィタノ

50

リドを、温血動物又はヒトでの腹腔内、皮下又は静脈内使用に許容される組成物の形態で提供する。例えば、このような組成物は、１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドのための担体として、緩衝リン酸塩溶液などの生理学的に許容される溶液を含有してもよい。好ましくは、溶液は、生理学的 pH である。特別な実施形態では、組成物を、直接患者に注入して、静脈内投与により腫瘍に灌流させる。

【 0 0 6 8 】

本発明による製剤は、１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドを温血動物又はヒトに投与するために適した濃度で含有し、その濃度は、投与方法に応じて、約 0.3 % から 95 %、好ましくは、約 2.5 % から 90 % である。懸濁液の場合には、濃度は通常、30 % 以下であり、好ましくは約 2.5 % であり；逆に、１種又は複数のアントラキノンを有する錠剤、糖衣丸及びカプセルでは、１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドの必要用量の容易な摂取を保証するために、濃度は好ましくは、約 0.3 % 以上である。１種又は複数のウィタノリドを含有する製剤での患者の治療を好ましくは、一定期間にわたって脂質過酸化を実質的に阻害するに十分である１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドの用量を１回又は複数回投与することにより実施する。必要ならば、用量を、毎日か、数時間間隔で投与される複数の部分用量に分けて投与することができる。特別な場合には、製剤を、放射線又は化学療法などの１種又は複数の他の療法と共に、又はその後に使用することができる。１種又は複数のウィタノリド及びウィタナミドの投与用量は、治療される患者（温血動物種又はヒト）、治療される患者の全身状態及び治療される疾患のタイプに左右される。

【 0 0 6 9 】

前記の記載は本発明を詳述することを目的としているにすぎず、本発明は、添付の請求項にのみ制限される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 0 】

【 図 1 】化合物 1 で観察される選択 H M B C () 及び C O S Y () 相関を示す化学構造である。

【 図 2 】化合物 9 の選択 T O C S Y () 相関を示す化学構造である。

【 図 3 】化合物 2 及び 3 の重要な H M B C () 及び C O S Y () 相関を示す化学構造である。

【 図 4 】化合物 1 ~ 9 及び 1 4 ~ 1 6 による脂質過酸化の阻害を示すグラフである。3 分間隔で 2 1 分間、蛍光強度を監視した。示されている阻害パーセンテージは、2 1 分目に D M S O 対照に対して算出した。試験された化合物の濃度は、1 ~ 3、5 及び 9 では 1 μ g / m L ; 4、6 ~ 8 では 0.5 μ g / m L ; 1 5 では 1 0 0 μ g / m L ; 1 6 では 5 0 μ g / m L ; 1 7 では 1 0 μ g / m L であった。市販の抗酸化剤 B H A、B H T 及び T B H Q は 1 μ g / m L で試験した。表されているデータは、平均 \pm 1 標準偏差 (n = 2) を示している。

【 図 5 】ウィタノリド 1 0 ~ 1 3 による脂質過酸化の阻害パーセントを示すグラフである。試験された化合物は、1 0 0 μ g / m L の 1 0 及び 1 3 であり；1 2 及び 1 1 はそれぞれ、1 0 及び 5 0 μ g / m L であった。示されているデータは、平均 \pm 1 標準偏差 (n = 2) を示している。

【図 1】

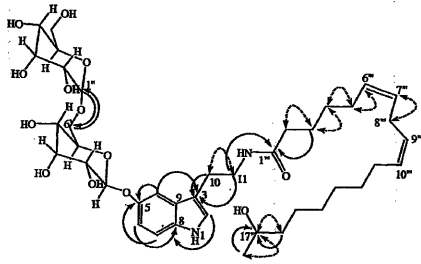


Figure 1

【図 2】

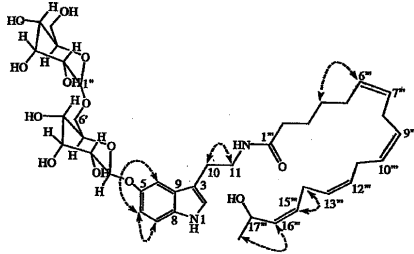
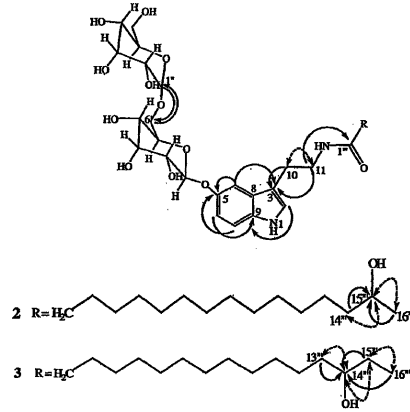


Figure 2

【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 36/81 (2006.01) A 6 1 K 35/78 R

(72)発明者 ナイール、ムラリードハラン、ジー．
アメリカ合衆国、ミシガン、オケモス、 イー．サンウィンド ドライブ 3 9 3 4

(72)発明者 ジャヤブラカサム、ボレッドデュラ
アメリカ合衆国、ミシガン、イースト ランシング、 チェリー レーン 7 0 4、アパートメン
ト ナンバー 2 0 7

審査官 守安 智

(56)参考文献 MATSUDA, H., et al., Bioorg. Med. Chem., 9, pp.1499-1507 (2001)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C07H 1/00-99/00
A61K 31/00-31/80
A61P 1/00-43/00
CAplus/REGISTRY(STN)