

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成29年5月18日 (2017.5.18)

【公開番号】特開2016-3200(P2016-3200A)

【公開日】平成28年1月12日 (2016.1.12)

【年通号数】公開・登録公報2016-002

【出願番号】特願2014-123671(P2014-123671)

【国際特許分類】

A 6 1 K 31/05 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/353 (2006.01)

A 6 1 K 31/192 (2006.01)

A 6 1 K 31/365 (2006.01)

A 6 1 K 31/7048 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 2 3 L 33/10 (2016.01)

【F I】

A 6 1 K 31/05

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 K 31/353

A 6 1 K 31/192

A 6 1 K 31/365

A 6 1 K 31/7048

A 6 1 P 37/04

A 2 3 L 1/30 Z

A 2 3 L 1/30 B

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月17日 (2017.3.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 8】

カテキン類の優れた生理機能が数多く報告される一方で、カテキン類の生体内動態に関する研究も広く行われている。カテキン類は生体内への吸収量が非常に低く、経口摂取した大部分のカテキン類は腸内において腸内微生物（腸内細菌）の作用により分解され、代謝物として生体内へ吸収されることが示されている。腸内微生物によるカテキン類の代謝に関する報告は多く（非特許文献 3 - 6 参照）、主な代謝物として 5 - フェニル - ____ - バレロラクトン（5-phenyl-____-valerolactone）や 5 - フェニル - 4 - ヒドロキシ - 吉草酸（5-phenyl-4-hydroxy-valeric acid）などが挙げられる。また、5 - フェニル吉草酸（5-phenyl-valeric acid）、3 - フェニルプロピオン酸（3-phenyl-propionic acid）、フェニル酢酸（phenyl acetic acid）、安息香酸（benzoic acid）など様々な代謝物が尿中から見出されている（非特許文献 7 - 9 参照）。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

カテキン代謝物の生体内での機能性に関する知見としては、上記に示した5-フェニル-___-パレロラクトン及び5-フェニル-4-ヒドロキシ吉草酸の血圧上昇抑制作用、5-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-___-パレロラクトンの抗炎症作用、5-(3,4,5-トリヒドロキシフェニル)-___-パレロラクトンの食道扁平上皮癌細胞、ヒト結腸腺癌細胞に対する増殖抑制効果及び抗炎症作用などが報告されている(特許文献3、非特許文献10、11参照)。しかしながら、カテキン代謝物又はその誘導体の免疫細胞増殖作用や免疫賦活作用については知られていない。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

本発明者らは、主なカテキン類の代謝物として報告のある1-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-3-(2,4,6-トリヒドロキシフェニル)-プロパン-2-オール、1-(3-ヒドロキシフェニル)-3-(2,4,6-トリヒドロキシフェニル)-プロパン-2-オール、2-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-3,4-ジヒドロ-2H-1-ベンゾピラン-3,5,7-トリオール、5-フェニル吉草酸、5-(3-ヒドロキシフェニル)-レブリン酸、5-フェニル-___-パレロラクトン、3-フェニルプロピオン酸の生理活性作用を検討した。その結果、これらのカテキン代謝物には、免疫賦活と深く関与するマウス脾臓CD4陽性T細胞及びマウスパイエル板内の細胞の増殖促進効果があることを見だし、本発明を完成した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0050】

本件化合物は、例えば次の文献に示す公知の有機化学合成法(Chem. Rev., 89, 4, 863-927, 1989.; 有機合成化学会誌, 59, 2, 109-120, 2001; Adv. Synth. Catal. 346, 111-124, 2004; Angew. Chem. Int. Ed., 48, 6507-6510, 2009; J. Agric. Food Chem., 57, 1231-1238, 2009; SYNTHESIS, 9, 1512-1520, 2010; Bioorg. Med. Chem. Lett., 15, 873-876, 2005)を組み合わせることにより得ることができる。例えば、5-(3-ヒドロキシフェニル)-___-パレロラクトンの場合は3-(tert-ブチルジメチルシロキシ)プロモベンゼン[(3-(tert-Butyldimethylsiloxy)bromobenzene)を基質とし、スワーソン酸化やウィッティヒ反応を含む7つの反応を用いることで調製することが可能である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0054

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0054】

式(I)で表わされる化合物を、式(III)のR₁が水酸基で表わされる5-フェニル-4-ヒドロキシ吉草酸、式(III)のR₁が水素で表される5-フェニル吉草酸、式(V-1)、式(V-2)、式(V-3)、式(VI-1)、式(VI-2)、式(VI-3)、式(VI-4)で表わされる5-フェニル-___-パレロラクトンに変換する能力を有する微生物の好ましい例としては、ユウバクテリウム属細菌及びクロスリジウム属細菌(新学名としてフラボニフラクター属細菌に属する細菌)を挙げることができ、さらに好ましくは、ユウバクテリウム・ブラウティ:

Eubacterium plautii (新学名; フラボニフラクター・ブラウティ: Flavonifractor plautii) ATCC29863株、ユウバクテリウム・ブラウティ: Eubacterium plautii (新学名; フラボニフラクター・ブラウティ: Flavonifractor plautii) MT42株 (受託番号 F E R M P - 2 1 7 6 5) 及びクロストリジウム・オルビシンデンス: Clostridium orbiscindens (新学名; フラボニフラクター・ブラウティ: Flavonifractor plautii) ATCC49531株を挙げることができる。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

カテキン類を式(I)で表わされる化合物に変換する能力を持つ微生物と、式(I)で表わされる化合物を式(III)のR₁が水酸基で表わされる5-フェニル-4-ヒドロキシ吉草酸、式(III)のR₁が水素で表される5-フェニル吉草酸、式(V-1)、式(V-2)、式(V-3)、式(VI-1)、式(VI-2)、式(VI-3)、式(VI-4)記載の5-フェニル-__-バレロラクトンに変換する能力を有する微生物を共存させた培養菌体懸濁液又は培養液に、カテキン類及び/又はカテキン含有物を基質として添加し、嫌気条件下でインキュベーション処理することで上記の5-フェニル-4-ヒドロキシ吉草酸、5-フェニル吉草酸及び/又は5-フェニル-__-バレロラクトン含有物を容易に得ることができる。インキュベーション処理方法については、上記微生物を培養後、集菌したものを緩衝液や生理食塩水、水などに懸濁させ基質を添加する方法、若しくは前記微生物の培養時あるいは培養開始後一定期間経過後に基質を添加する方法がある。さらに、前記微生物の生育する培養液中に基質を添加し、嫌気条件下でインキュベーション処理することで5-フェニル-4-ヒドロキシ吉草酸、5-フェニル吉草酸及び/又は5-フェニル-__-バレロラクトンを容易に得ることもできる。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0060】

本件化合物の抱合体は、有機合成法及び微生物変換法により得られた5-フェニル-__-バレロラクトンを基質とし、次の文献に示す公知の有機化学合成法(J. Nat. Prod., 76, 157-169, 2013.; Org. Biomol. Chem., 3(5), 886-900, 2005)を組み合わせることにより調製することができる。例えば、5-フェニル-__-バレロラクトンのグルクロン酸抱合体は、次の文献に示す光延反応(Angew. Chem. Int. Ed., 48, 6507-6510, 2009)を用いて基質をグルクロン酸化させることで調製することが可能である。その他の調製法としては、ラットやマウスなどにカテキン類を投与し、回収した尿からカテキン代謝物抱合体を精製する方法や、抱合化酵素が含まれる動物の臓器ホモジネートを粗酵素として利用する方法、UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)遺伝子組み換え酵母をカテキン類に加えてインキュベーション処理する方法などが挙げられる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

【表 1】

化合物	化合物名
I a	(S)-1-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-3-(2,4,6-トリヒドロキシフェニル)-プロパン-2-オール
I b	(S)-1-(3-ヒドロキシフェニル)-3-(2,4,6-トリヒドロキシフェニル)-プロパン-2-オール
I c	(R)-1-(3-ヒドロキシフェニル)-3-(2,4,6-トリヒドロキシフェニル)-プロパン-2-オール
II	(2R,3R)-2-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-3,4-ジヒドロ-2H-1-ベンゾピラン-3,5,7-トリオール
III a	(R)-5-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-4-ヒドロキシ吉草酸
III b	5-(3,5-ジヒドロキシフェニル)吉草酸
III c	5-(3-ヒドロキシフェニル)吉草酸
III d	(R)-5-(3-ヒドロキシフェニル)-4-ヒドロキシ吉草酸
III e	(S)-5-(3-ヒドロキシフェニル)-4-ヒドロキシ吉草酸
IV	5-(3-ヒドロキシフェニル)レプリン酸
V-1 a	(R)-5-(3-ヒドロキシフェニル)- γ -バレロラクトン
V-1 b	(S)-5-(3-ヒドロキシフェニル)- γ -バレロラクトン
V-2 a	(R)-5-(3-スルフォオキシフェニル)- γ -バレロラクトン
V-3 a	(R)-5-[3-(β -D-グルコピラヌロシルオキシ)フェニル]- γ -バレロラクトン
VI-1 a	(R)-5-(3,5-ジヒドロキシフェニル)- γ -バレロラクトン
VI-2 a	(R)-5-(3-スルフォオキシ-5-ヒドロキシフェニル)- γ -バレロラクトン
VI-3 a	(R)-5-[3-(β -D-グルコピラヌロシルオキシ-5-ヒドロキシ)フェニル]- γ -バレロラクトン
VI-4 a	(R)-5-(3,5-ジスルフォオキシフェニル)- γ -バレロラクトン
VII a	3-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-プロピオン酸
VII b	3-(3-ヒドロキシフェニル)-プロピオン酸

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

(製造例 2)

エガーテラ・レンタ JCM9979 株とユウバクテリウム・ブラウティ (フラボニフラクター・ブラウティ) ATCC29863 株及び大腸菌 K12 株の共存下での (R)-5-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-4-ヒドロキシ吉草酸 [(R)-5-(3,5-Dihydroxyphenyl)-4-Hydroxy-Valeric Acid] (化合物 (IIIa)) 及び (R)-5-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-___-バレロラクトン [(R)-5-(3,5-dihydroxyphenyl)-___-valerolactone] (化合物 (VI-1a)) の製造方法を以下に示す。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

エガーテラ・レンタ JCM9979 株を 30 ml の GAM ブイヨンに植菌し、37 で 48 時間嫌気培養し、前培養液とした。大腸菌 K12 株及びユウバクテリウム・ブラウティ (フラボニフラクター・ブラウティ) ATCC29863 株は 10 ml の GAM ブイヨンで 24 時間嫌気培養し、前培養液とした。() - エピガロカテキン 290 mg を含む 100 ml の GAM ブイヨンに JCM9979 株、大腸菌 K12 株の前培養液を加え、37 で 48 時間嫌気培養した。培養液 1 ml をサンプリングして高速遠心分離 (15000 × g、10 分) により菌体を除去し、上清を製造例 1 の LC/MS 分析と同条件で分析することで (S)-1-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-3-(2,4,6-トリヒドロキシフェニル)-プロパン-2-オールの生成を確認した。次に、上記 ATCC29863 株の前培養液を加えて 37 で 48 時間嫌気培養を行った。その後、培養液 1 ml をサンプリングして高速遠心分離 (15000 × g、10 分) に供し、得られた上清を製造例 1 と同様の LC/MS 分析に供して (R)-5-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-4-ヒドロキシ吉草酸及び (R)-5-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-___-バレロラクトンの生成を確認した。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

培養液を高速遠心分離（10000×g、20分間、10℃）し、菌体を除去した。上清に塩酸を加えpH3.5に調整した後、200mlの酢酸エチルで3回抽出した。酢酸エチル層に50mM炭酸ナトリウム水溶液100mlを加えよく混合し、遠心分離（5000×g、5分間）により2層分配させた。この酢酸エチル層に再度50mM炭酸ナトリウム水溶液100mlを加えて混合し、同様に遠心分離（5000×g、5分間）により2層分配を行った。この酢酸エチル層はエバポレーターにより濃縮乾固し、製造例1と同様に分取HPLC、LC/MS分析処理を行い、(R)-5-(3,5-ジヒドロキシフェニル)-___-バレロラクトンを45mg得た。回収した炭酸ナトリウム水溶液は約20mlになるまでエバポレーターで濃縮し、塩酸を加えてpH2.0～4.0に調整後、分取HPLCに供した。分取HPLC条件を以下に記載する。

【手続補正 12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

Wistar系ラット（、日本チャールスリバー株式会社）5匹から糞便を5.6g採取し、GAMブイヨン300mlに入れ、37℃で2日間嫌気培養を行った。次に、この培養液を滅菌済みの遠心管に入れ、9000×gで20分間遠心分離を行った。上清を捨て、菌体に200mlの滅菌水を加えて菌体を洗浄した後、再度遠心分離（9000×g、20分）を行った。得られた菌体を(-)-エピガロカテキン50mgを含む100mlの0.2Mリン酸緩衝液（pH7.2）に懸濁した。37℃で10日間嫌気培養した。その後、培養液に2M塩酸水を加えてpH4.0に調整し、遠心分離（9000×g、20分）に供して菌体を除去した。上清を100mlの酢酸エチルで3回抽出を行った後、酢酸エチル層を合わせてエバポレーターで減圧濃縮し、得られた濃縮液を10%メタノール水溶液で溶解して分取HPLCに供した。分取HPLCは製造例1の方法に従って行った。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

(製造例6)

エガテラ・レンタJCM9979株とユウバクテリウム・ブラウティ（フラボニフラクター・ブラウティ）MT42株及び大腸菌K12株の共存下での(R)-5-(3-ヒドロキシフェニル)-4-ヒドロキシ吉草酸[(R)-5-(3-hydroxyphenyl)-4-hydroxy-valeric acid]（化合物(IIIId)）及び(R)-5-(3-ヒドロキシフェニル)-___-バレロラクトン[(R)-5-(3-hydroxyphenyl)-___-valerolactone]（化合物(V-1a)）の製造方法を以下に示す。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0095】

エガーテラ・レンタ J C M 9 9 7 9 株を 3 0 m l の G A M ブイオンに植菌し、37 で 4 8 時間嫌気培養し、前培養液とした。大腸菌 K 1 2 株及びユウバクテリウム・ブラウティ (フラボニフラクター・ブラウティ) M T 4 2 株は 1 0 m l の G A M ブイオンで 2 4 時間嫌気培養し、前培養液とした。(-) - エピカテキン 2 0 0 m g を含む 2 0 0 m l の G A M ブイオンに J C M 9 9 7 9 株、大腸菌 K 1 2 株の前培養液を加え、37 で 4 8 時間嫌気培養した。次に、培養液 1 m l をサンプリングして高速遠心分離 (1 5 0 0 0 × g 、 1 0 分) により菌体を除去し、上清を製造例 1 と同様の L C / M S 分析に供して (S) - 1 - (3 - ヒドロキシフェニル) - 3 - (2 , 4 , 6 - トリヒドロキシフェニル) - プロパン - 2 - オールの生成を確認した。その後、さらに上記 M T 4 2 株の前培養液を加えて 37 で 4 8 時間嫌気培養を行い、(R) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - 4 - ヒドロキシ吉草酸及び (R) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - ___ - バレロラクトンへの変換を行った。培養後、製造例 2 に記載の方法に準じて培養液を調製し、(R) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - ___ - バレロラクトンを 5 1 m g 得た。また、製造例 2 と同様の方法で培養液から (R) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - 4 - ヒドロキシ吉草酸のナトリウム塩を 5 3 m g 得た。

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

(製造例 8)

エガーテラ・レンタ J C M 9 9 7 9 株とユウバクテリウム・ブラウティ (フラボニフラクター・ブラウティ) A T C C 4 9 5 3 1 株及び大腸菌 K 1 2 株の共存下での (S) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - 4 - ヒドロキシ吉草酸 [(S) - 5 - (3 - hydroxyphenyl) - 4 - hydroxy-valeric acid] (化合物 (I I I e)) 及び (S) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - ___ - バレロラクトン [(S) - 5 - (3 - hydroxyphenyl) - ___ - valerolactone] (化合物 (V - 1 b)) の製造方法を以下に示す。

【手続補正 1 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

エガーテラ・レンタ J C M 9 9 7 9 株を 3 0 m l の G A M ブイオンに植菌し、37 で 4 8 時間嫌気培養し、前培養液とした。大腸菌 K 1 2 株及びユウバクテリウム・ブラウティ (フラボニフラクター・ブラウティ) A T C C 4 9 5 3 1 株は 1 0 m l の G A M ブイオンで 2 4 時間嫌気培養し、前培養液とした。(+) - カテキン 2 9 0 m g を含む 3 0 0 m l の G A M ブイオンに J C M 9 9 7 9 株、大腸菌 K 1 2 株の前培養液を加え、37 で 4 8 時間嫌気培養した。培養後、培養液 1 m l をサンプリングし、高速遠心分離 (1 5 0 0 0 × g 、 1 0 分) して菌体を除去し、上清を製造例 1 と同様の L C / M S 分析に供して (R) - 1 - (3 - ヒドロキシフェニル) - 3 - (2 , 4 , 6 - トリヒドロキシフェニル) - プロパン - 2 - オールの生成を確認した。その後、さらに上記 A T C C 4 9 5 3 1 株の前培養液を加えて 37 で 4 8 時間嫌気培養を行い、(S) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - 4 - ヒドロキシ吉草酸及び (S) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - ___ - バレロラクトンへの変換を行った。製造例 2 に記載の方法に準じて培養液を調製し、(S) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - ___ - バレロラクトンを 4 1 m g 得た。また、製造例 2 に記載の方法と同様の方法で培養液から (S) - 5 - (3 - ヒドロキシフェニル) - 4 -

ヒドロキシ吉草酸のナトリウム塩を 52 mg 得た。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0114】

1.0 mL のアセトンに、(R)-5-(3-ヒドロキシフェニル)-___-バレロラクトン 48.7 mg (0.25 mmol) と炭酸カリウム 105 mg (0.75 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌させた。次に、クロロメチルメチルエーテル (chloromethyl methyl ether) を 80.4 μ L (0.50 mmol) 加え、室温で 2 日間攪拌させた。攪拌後、5% クエン酸溶液を加えて溶液を pH 4.0 に調整し、水を 3 mL 加えた後、クロロホルム 5 mL で 3 回抽出した。クロロホルム層を水 5 mL と飽和食塩水 5 mL で洗浄後、エバポレーターで減圧濃縮し、(R)-5-(3-メトキシメチルオキシフェニル)-___-バレロラクトン [(R)-5-(3-methoxymethyloxyphenyl)-___-valerolactone] を 63.3 mg (0.24 mmol、収率 96.0%) 得た。

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0115

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0115】

得られた (R)-5-(3-メトキシメチルオキシフェニル)-___-バレロラクトンの全量 (0.24 mmol) をメタノール 1 mL に溶解させ、3 M 水酸化カリウム溶液を 100 μ L 加えて室温で 1 時間攪拌した。次に、1 M ギ酸 - ナトリウムバッファーを加えて溶液を pH 4.0 に調整し、水を 3 mL 加えた後、酢酸エチル 4 mL で 3 回抽出した。さらに、酢酸エチル層にトリエチルアミンを 100 μ L 加え、エバポレーターで減圧濃縮することにより、5-(3-メトキシメチルオキシフェニル)吉草酸 [5-(3-methoxymethyloxyphenyl)-valeric acid] のトリエチルアミン塩を 58.4 mg (0.23 mmol、収率 95.0%) 得た。

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0128

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0128】

(製造例 13)

有機合成方法による (R)-5-(3-スルフォオキシフェニル)-___-バレロラクトン (化合物(V-2a)) の製造方法を以下に示す。

【手続補正 20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0129

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0129】

30.9 mg (0.16 mmol) の (R)-5-(3-ヒドロキシフェニル)-___-バレロラクトンにピリジン 10 mL、硫酸ナトリウム 5 mg 及び三酸化硫黄ピリジン 152.2 mg (0.96 mmol) を加え、室温で 3 日間攪拌させた。次に、0.1 M 酢酸バッファー (pH 4.0) と水を加えて反応停止させてエバポレーターで減圧濃縮し、得られた濃縮残渣を 3 mL の水で溶解して分取 HPLC に供した。分取 HPLC 条件を以下

に記載する。

【手続補正 2 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 1】

分画したフラクションをエバポレーターで減圧濃縮し ((R) - 5 - (3 - スルフォオキシフェニル) - ____ - バレロラクトンの粗精製物を得た。

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 2】

次に、得られた粗精製物に水を加え、エバポレーターにより減圧濃縮してアセトニトリルを除去した。この濃縮液を S U P E L C O D I S C O V E R Y D S C - 1 8 カラムにのせ、水 3 0 m l で洗浄した後、アセトニトリル 3 0 m l にて (R) - 5 - (3 - スルフォオキシフェニル) - ____ - バレロラクトンを溶出した。溶出後、得られたアセトニトリル溶出画分をエバポレーターで減圧濃縮して凍結乾燥に供することにより、白色粉末状の (R) - 5 - (3 - スルフォオキシフェニル) - ____ - バレロラクトンの精製物を 1 5 . 8 m g (0 . 0 6 m m o l 、収率 3 6 . 3 %) 得た。

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 4】

(製造例 1 4)

有機合成方法による (R) - 5 - (3 - スルフォオキシ - 5 - ヒドロキシフェニル) - ____ - バレロラクトン] (化合物 (VI-2a)) 及び (R) - 5 - (3 , 5 - ジスルフォオキシフェニル) - ____ - バレロラクトン (化合物 (VI-4a)) の製造方法を以下に示す。

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 5】

1 6 3 . 1 m g (0 . 7 8 m m o l) の (R) - 5 - (3 , 5 - ヒドロキシフェニル) - ____ - バレロラクトンにピリジン 1 0 m l と硫酸ナトリウム 5 m g を加え、室温で 1 0 分間攪拌した。次に、三酸化硫黄ピリジン を 7 9 0 . 4 m g (4 . 6 8 m m o l) 加え、室温で 1 時間攪拌させた。攪拌後、0 . 2 M リン酸二水素ナトリウムバッファー (p H 7 . 2) を加えて反応停止させ、エバポレーターで減圧濃縮して得られた濃縮残渣を 3 m l の水で溶解し分取 H P L C に供した。分取 H P L C 条件を以下に記載する。

【手続補正 2 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 7】

分画したフラクションをエバポレーターで減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、(R)-5-(3-スルフォオキシ-5-ヒドロキシフェニル)-__-バレロラクトン及び(R)-5-(3,5-ジスルフォオキシフェニル)-__-バレロラクトンの粗精製物をそれぞれ得た。得られた各粗精製物をS U P E L C O D I S C O V E R Y D S C - 18カラムにO D S (C h r o m a t o r e x 15-30 μ m、10 cm³)を追加充填したカラムにのせ、水160 mLで洗浄した後、アセトニトリル175 mLにて溶出した。得られた各アセトニトリル溶出画分をそれぞれエバポレーターで減圧濃縮して凍結乾燥に供することにより、白色粉末状の(R)-5-(3-スルフォオキシ-5-ヒドロキシフェニル)-__-バレロラクトン及び(R)-5-(3,5-ジスルフォオキシフェニル)-__-バレロラクトンの精製物をそれぞれ12.5 mg (0.04 mmol、収率5.2%)、14.2 mg (0.03 mmol、収率4.4%)得た。

【手続補正26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0138

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0138】

得られた精製物を¹H-NMRで分析したところ以下のケミカルシフト値が得られ、目的の化合物であることを確認した。

(R)-5-(3-スルフォオキシ-5-ヒドロキシフェニル)-__-バレロラクトン：
¹H-NMR (400 MHz, 重水素化メタノール)： 6.24 (2H, s), 6.19 (1H, s), 4.79 (1H, m), 2.91 (2H, d, J = 6.8 Hz), 2.55 (1H, m), 2.46 (1H, m), 2.33 (1H, m), 2.00 (1H, m)

(R)-5-(3,5-ジスルフォオキシフェニル)-__-バレロラクトン：¹H-NMR (400 MHz, 重水素化メタノール)： 7.14 (1H, t, J = 7.6 Hz), 6.70 (3H, d, J = 1.1 Hz), 3.70 (2H, s), 2.78 (2H, t, J = 6.3 Hz), 2.52 (2H, t, J = 6.5 Hz)

【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0139

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0139】

(製造例15)

ラットを用いた(-)-エピカテキン経口投与による(R)-5-[3-(D-グルコピラヌロシルオキシ)フェニル]-__-バレロラクトン(化合物((V-3a))の製造方法を以下に示す。

【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0141

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0141】

回収した尿230 mLを合一し、エバポレーターで約45 mLになるまで減圧濃縮した。次に、得られた濃縮液にメタノール225 mLを加えてよく混合した後、高速遠心分離(3000 × g、10分間、4)によりタンパク質沈殿物を除去した。得られた上清をエバポレーターで約45 mLになるまで減圧濃縮し、水を加えて450 mLとした後、酢酸を加えてpH 3.0に調整した。0.1 Mリン酸-クエン酸バッファーでpH 3.0に調整した尿水溶液をO a s i s H L Bカートリッジ(W a t e r s、35 cc)に通液し

た後、水 175 mL、20%メタノール 175 mL の順で洗浄した後、40%メタノール 175 mL にて (R) - 5 - [3 - (D - グルコピラヌロノシルオキシ) フェニル] - ____ - バレロラクトンを含む画分を溶出した。得られた 40%メタノール溶出画分をエバポレーターで減圧濃縮し、濃縮残渣に水 5 mL を加えて分取 HPLC に供した。分取 HPLC 条件は以下に記載する。

【手続補正 29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0143

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0143】

分取後、得られた分取液を LC / MS 分析に供して (R) - 5 - [3 - (D - グルコピラヌロノシルオキシ) フェニル] - ____ - バレロラクトンが含まれることを確認した。LC / MS 条件を以下に記載する。

【手続補正 30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0145

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0145】

さらに、(R) - 5 - [3 - (D - グルコピラヌロノシルオキシ) フェニル] - ____ - バレロラクトンが含まれる画分をリサイクル HPLC に供し、精製を行った。リサイクル HPLC 条件は以下に記載する。

【手続補正 31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0147

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0147】

分取後、本製造例 15 における上記の LC / MS 分析により、分画した画分に (R) - 5 - [3 - (D - グルコピラヌロノシルオキシ) フェニル] - ____ - バレロラクトンが含まれていることを確認した。この (R) - 5 - [3 - (D - グルコピラヌロノシルオキシ) フェニル] - ____ - バレロラクトンが含まれる画分をエバポレーターで濃縮乾固し、乾固物に 5 mL の水を加えて溶解した後、再度減圧下で濃縮乾固した。この操作を 3 回繰り返すことで、有機溶媒に含まれていた酸を完全に除去した。最後に、乾固物に水 2 mL を加えて溶解し、凍結乾燥に供することで (R) - 5 - [3 - (D - グルコピラヌロノシルオキシ) フェニル] - ____ - バレロラクトンを 5.0 mg 得た。

【手続補正 32】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0148

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0148】

(製造例 16)

ラットを用いた (-) - エピガロカテキン経口投与による (R) - 5 - [3 - (D - グルコピラヌロノシルオキシ - 5 - ヒドロキシ) フェニル] - ____ - バレロラクトン (化合物 (VI-3a)) の製造方法を以下に示す。

【手続補正 33】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0149

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0149】

8週齢のWistar系ラット（、日本チャールスリバー株式会社）6匹を精製飼料で1週間予備飼育し、試験前日より絶食させて試験に用いた。投与サンプルは（-）-エピガロカテキンを生理食塩水に溶解させた溶液とし、各ラットに20mg/1.7mLずつ胃内強制投与した。投与は4日間反復して行い、それぞれ投与後6時間～24時間の尿を回収した。回収した尿250mLを合一し、製造例15記載の方法に準じて調製及び分取精製を行うことで、（R）-5-[3-（D-グルコピラヌロノシルオキシ-5-ヒドロキシ）フェニル]-__-バレロラクトンを28.0mg得た。

【手続補正34】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0163

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0163】

（製造例：錠剤）

（R）-5-（3-ヒドロキシフェニル）-__-バレロラクトン（0.5重量%）、キシリトール（33.8重量%）、マンニトール（30.6重量%）、微結晶性セルロース（6.1重量%）、着香料（14.1重量%）、ステアリン酸（4.3重量%）、タルク（0.6重量%）及びソルビトール（10.0重量%）を混合した粉体を錠剤プレスによって圧縮し、（R）-5-（3-ヒドロキシフェニル）-__-バレロラクトンを含有する免疫機能の維持向上を目的とした錠剤を得た。

【手続補正35】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0164

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0164】

（製造例：皮膚外用液剤）

精製水に（R）-5-（3,5-ジスルフォオキシフェニル）-__-バレロラクトン（5.0重量%）、グリセリン（5.0重量%）及びプロピレングリコール（4.0重量%）を加え溶解した。一方、エタノール（0.1重量%）にオレイルアルコール（0.1重量%）及び安息香酸（0.05重量%）を室温で溶解した。これを精製水部に加えて可溶化してる過後、充填することにより、（R）-5-（3,5-ジスルフォオキシフェニル）-__-バレロラクトンを含有する免疫機能の維持向上を目的とした皮膚外用液剤を得た。

【手続補正36】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0169

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0169】

（製造例：スポーツ飲料）

（R）-5-（3-スルフォオキシ-5-ヒドロキシフェニル）-__-バレロラクトン（0.1mg）、ビタミンB₁塩酸塩（0.45mg）、ビタミンB₂（0.2mg）、ビタミンC（10mg）、ナイアシン（0.8mg）、パントテン酸Ca（0.22mg）、クエン酸鉄アンモニウム（12.57mg）、クエン酸（100mg）及び果糖（2.5g）の成分にイオン交換水を加え全量を200mLとし、（R）-5-（3-スルフォオキシ-5-ヒドロキシフェニル）-__-バレロラクトンを含有する免疫機能の維持向上を目的としたスポーツ飲料を調製した。

