

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-535720

(P2010-535720A)

(43) 公表日 平成22年11月25日 (2010.11.25)

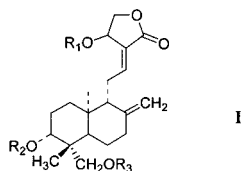
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 307/33 (2006.01)	C O 7 D 307/32	Q 4 C O 3 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 3 7
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C O 6 3
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C O 8 6
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-519331 (P2010-519331)	(71) 出願人	501455530
(86) (22) 出願日	平成20年8月7日 (2008.8.7)		パノラマ リサーチ, インコーポレイティ ド
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月8日 (2010.4.8)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 89 サニーバール ボルドー ドライブ 1230
(86) 国際出願番号	PCT/CN2008/071919	(74) 代理人	100081776
(87) 国際公開番号	W02009/018780		弁理士 大川 宏
(87) 国際公開日	平成21年2月12日 (2009.2.12)	(72) 発明者	ワン ユイアン
(31) 優先権主張番号	200710029644.3		中華人民共和国 コワンドン コワンチョ ウ ファンプロードウェスト 601
(32) 優先日	平成19年8月8日 (2007.8.8)	(72) 発明者	ジャン シャオジュン
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		中華人民共和国 コワンドン コワンチョ ウ ファンプロードウェスト 601
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アンドログラフォライド誘導体及びその医薬用途

(57) 【要約】

【解決手段】 本発明は、下記の一般式 (I) で表されるアンドログラフォライド (Andrographolide) 誘導体、

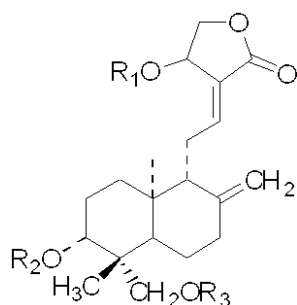


一般式 (I) 中、 R_1 、 R_2 、及び R_3 は同一でも異なってもよく、水素、置換或いは未置換の有機酸の酸基、無機酸の酸基、アルキル基、アリール基 (aryl) 或いはヘテロアリール基 (heteroaryl) を表し、さらに、 R_1 、 R_2 、及び R_3 の少なくとも一つが(R)-リポ酸基、(S)-リポ酸基、又は両者の混合物、相応するジヒドロリポ酸 (dihydrolipoic acid)、N-アセチルシステイン (N-acetylcysteine) である、記載の誘導体は良好な抗腫瘍効果を持ち、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し、グラム陽性菌、黄色ブドウ球菌、耐薬菌MRSA5676とMRSA5677を直接的殺

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記的一般式 (I) で表されるアンドログラフォライド (Andrographolide) 誘導体、
【化 1】



I

10

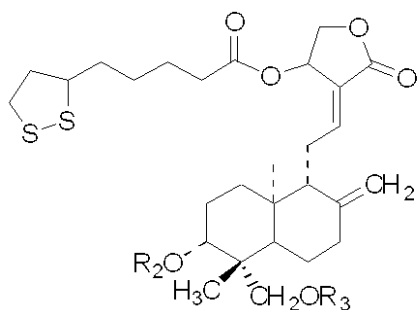
一般式 (I) 中、 R_1 、 R_2 、及び R_3 は同一でも異なってもよく、水素、置換或いは未置換の有機酸の酸基、無機酸の酸基、アルキル基、アリール基 (aryl) 或いはヘテロアリール基 (heteroaryl) を表し、さらに、 R_1 、 R_2 、及び R_3 の少なくとも一つが (R)-リポ酸基、(S)-リポ酸基、又は両者の混合物、相応するジヒドロリポ酸 (dihydrolipoic acid)、N-アセチルシステイン (N-acetylcysteine) である。

【請求項 2】

誘導体が以下の一般式 (II) :

【化 2】

20



II

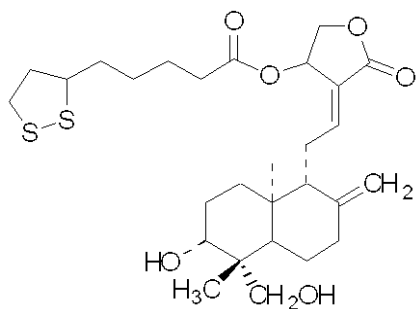
記載の有機酸基は脂肪酸基或いは芳香酸基で、脂肪酸基はアセトキシ基、プロピオン基、酪酸基、マロン酸基、ピルビン酸基、ケイ皮酸基、コハク酸基、クエン酸基、乳酸基、グルコン酸基、リポ酸基、N-アセチルシステイン酸基、芳香酸基は安息香酸基、無機酸基は硫酸基、硝酸基又はりん酸基を表し、請求項 1 記載のアンドログラフォライド誘導体。

30

【請求項 3】

誘導体が以下の一般式 (AL-1) :

【化 3】



AL-1

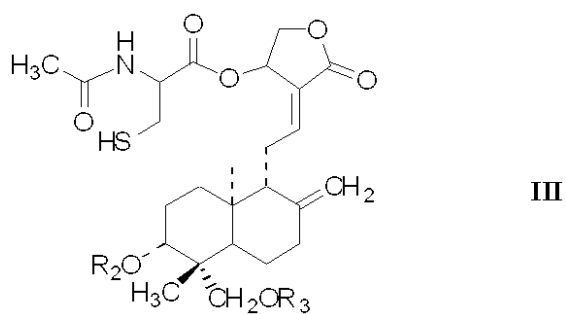
40

請求項 2 記載のアンドログラフォライド誘導体。

【請求項 4】

誘導体が以下の一般式 (III) :

【化 4】



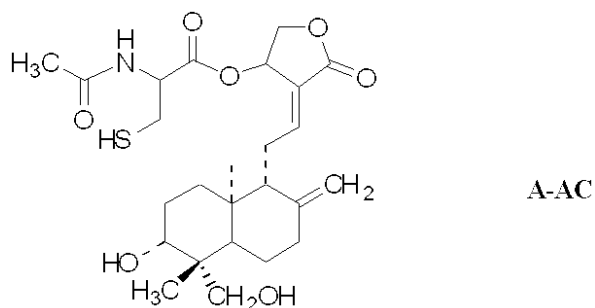
請求項1記載のアンドログラフォライド誘導体。

10

【請求項 5】

誘導体が以下の一般式 (A-AC) :

【化 5】



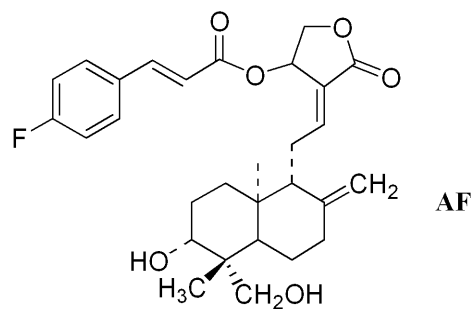
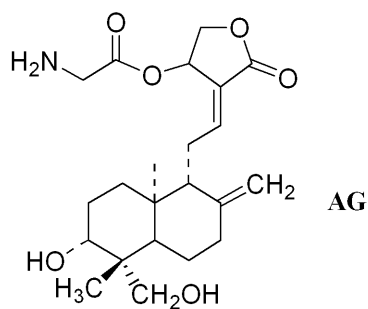
20

請求項4記載のアンドログラフォライド誘導体。

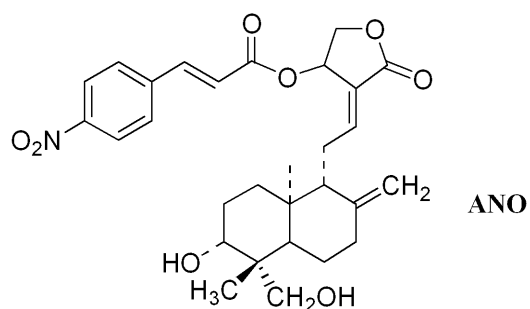
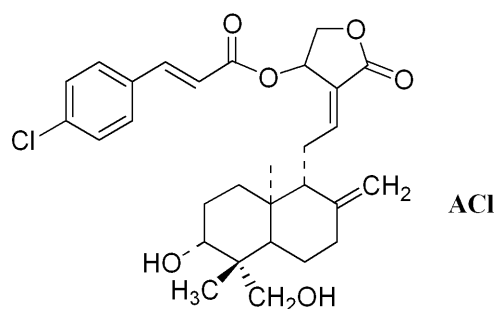
【請求項 6】

下記一つの一般式で表されるアンドログラフォライド誘導体、

【化 6】



30



40

、もしくはその薬学的に許容される塩。

【請求項 7】

癌を治療するための医薬品の製造における、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体或いは組成物の使用。

【請求項 8】

炎症を治療するための医薬品の製造における、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体或いは組成物の使用。

50

【請求項 9】

糖尿病を治療するための医薬品の製造における、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体或いは組成物の使用。

【請求項 10】

細菌またはウイルス感染を治療するための医薬品の製造における、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体或いは組成物の使用。

【請求項 11】

処置を必要とする対象に対して請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体或いは組成物を投与するを含む癌の治療方法。

【請求項 12】

白血病である請求項 11 に記載の癌。

【請求項 13】

処置を必要とする対象に対して請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体或いは組成物を投与するを含む炎症の治療方法。

【請求項 14】

処置を必要とする対象に対して請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体或いは組成物を投与するを含む糖尿病の治療方法。

【請求項 15】

処置を必要とする対象に対して請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体或いは組成物を投与するを含む細菌及びウイルス感染の治療方法。

【請求項 16】

請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のアンドログラフォライド誘導体、抗生物質と共に含む、薬学的組成物。

【請求項 17】

シプロフロキサシン (ciprofloxacin) である請求項 16 に記載の抗生物質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アンドログラフォライド誘導体及びその医薬用途に関する。

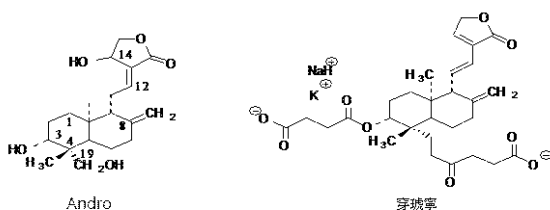
【背景技術】

【0002】

アンドログラフォライド (Andrographolide) は漢方薬アンドログラフィスの主要成分である。アンドログラフィスはアジア各国、中国、インド、日本、韓国を含め、幅広く炎症病気、例えばリュウマチ性関節炎、咽喉炎、下痢、細菌とウイルス感染に用いる。(非特許文献 1～5)。最近、研究によって、アンドログラフォライドは広域性抗癌作用があり、治療効果も好ましいことが示された。(非特許文献 6、7)。インドとマレーシアでは、幅広く糖尿病にも使われる。この30年以來、アンドログラフォライド及びその3種の誘導体穿琥寧、炎琥寧、蓮必治は中国で、もう広く臨床に使われる。アンドログラフォライド及びその誘導体穿琥寧、炎琥寧、蓮必治の一般式は下記である。

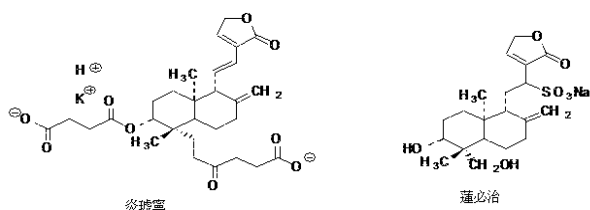
【0003】

【化1】



【0004】

【化 2】



【0005】

これらの薬物は炎症、熱、細菌及びウイルス感染性疾患の臨床症状を軽減することができる。(非特許文献8～12)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Zhao and Fang, Chin. Med. J. (Engl) 1991, 104, 770-775

【非特許文献2】Puri et al., J. Nat. Prod. 1993, 56, 995-999

【非特許文献3】Zhang and Tan, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1996, 23, 675-678

【非特許文献4】Zhang and Tan, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2000, 27, 358-363

【非特許文献5】Shen et al., Br. J. Pharmacol. 2002, 35, 399-406

【非特許文献6】Rajagopal et al., J. Exp. Ther. Oncol. 2003, 3, 147-158

【非特許文献7】Satyanarayana et al. Science 2003, 299, 363-370

20

【非特許文献8】Hendrickson et al., J. Bacteriol. 2001, 183, 7126-7134

【非特許文献9】Zhang and Tan, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1996, 23, 675-678

【非特許文献10】Zhang et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2000, 27, 358-363

【非特許文献11】Shen et al., Br. J. Pharmacol. 2002, 35, 399-406

【非特許文献12】Gabrielian et al., Phytomedicine 2002, 9, 589-597

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の一種の実施方法は一種新しいアンドログラフォライド誘導体を提供する。

【0008】

30

本発明他の一種の実施方法はアンドログラフォライド誘導体の薬学的に許容される塩を提供する。

【0009】

本発明他の一種の実施方法は記載するアンドログラフォライド誘導体、もしくはその薬学的に許容される塩、その薬物製剤等の製造方法を提供する。

【0010】

本発明他の一種の実施方法本細菌及びウイルス感染、炎症、癌病と糖尿病等薬物の製造にアンドログラフォライド誘導体の使用方法を提供する。もう一つの実施方法は細菌及びウイルス感染、炎症、癌病と糖尿病の治療方法を提供、処置を必要とする対象に対して有効量の記載のアンドログラフォライド誘導体を投与することも含む。

40

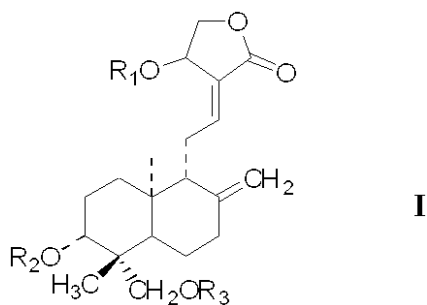
【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の新しいアンドログラフォライドは、下記の一般式(I)で表される。

【0012】

【化 3】



【0013】

10

一般式 (I) 中、 R_1 、 R_2 、及び R_3 は同一でも異なってもよく、水素、置換或いは未置換の下記のラジカル：有機酸の酸基、例えば脂肪酸と芳香酸基、アセトキシ基、プロピオン基、酪酸基、マロン酸基、ピルビン酸基、ケイ皮酸基、コハク酸基、クエン酸基、乳酸基、グルコン酸基、リポ酸基、N-アセチルシステイン酸基、アミノ酸基、安息香酸基と無機酸の酸基例えば、硫酸基、硝酸基、りん酸基或いはその塩類：アルキル基、アリール基 (aryl)、ヘテロアリール基 (heteroaryl) 等を含む、さらに、 R_1 、 R_2 、及び R_3 の少なくとも一つが (R)-リポ酸基、(S)-リポ酸基、又は両者の混合物、相応するジヒドロリポ酸 (dihydrolipoic acid)、N-アセチルシステイン (N-acetylcysteine) である。

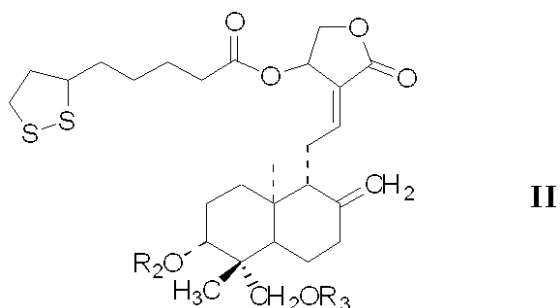
【0014】

20

新しいアンドログラフォライド誘導体の一般式 I の構造により、本発明のアンドログラフォライドは、下記的一般式 II で表される。

【0015】

【化 4】



30

【0016】

この中、 R_2 と R_3 は同一でも異なってもよく、その上、独立に水素、置換或いは未置換下記の下記のラジカルを示し：有機酸の酸基、例えば脂肪酸と芳香酸基、アセトキシ基、プロピオン基、酪酸基、マロン酸基、ピルビン酸基、ケイ皮酸基、コハク酸基、クエン酸基、乳酸基、グルコン酸基、リポ酸基、N-アセチルシステイン酸基、アミノ酸基、安息香酸基と無機酸の酸基例えば、硫酸基、硝酸基、りん酸基或いはその塩類：アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基等を含む。

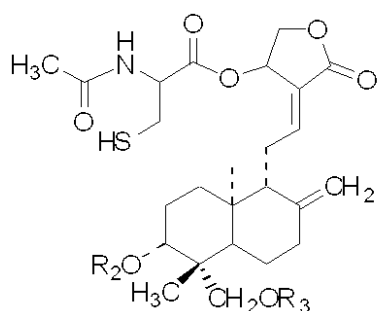
【0017】

40

新しいアンドログラフォライド誘導体の一般式 I の構造により、本発明のアンドログラフォライドは、下記的一般式 III で表される。

【0018】

【化 5】



III

【0019】

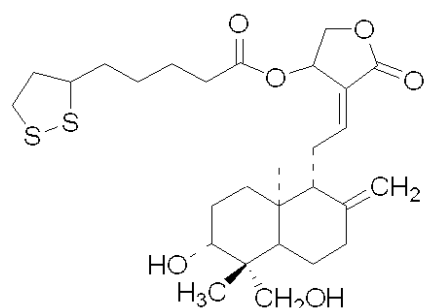
10

この中、 R_2 と R_3 は同一でも異なってもよく、その上、独立に水素、置換或いは未置換下記のラジカルを示し：有機酸の酸基、例えば脂肪酸と芳香酸基、アセトキシ基、プロピオン基、酪酸基、マロン酸基、ピルビン酸基、ケイ皮酸基、コハク酸基、クエン酸基、乳酸基、グルコン酸基、リポ酸基、N-アセチルシステイン酸基、アミノ酸基、安息香酸基と無機酸の酸基例えば、硫酸基、硝酸基、りん酸基或いはその塩類：アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基等を含む。新しいアンドログラフォライド誘導体の一般式IIの構造により、本発明優先の化合物は下記である：

【0020】

【化 6】

20



AL-1

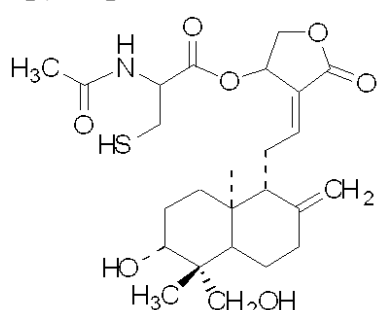
【0021】

新しいアンドログラフォライド誘導体の一般式IIIの構造により、本発明優先の化合物は下記である：

30

【0022】

【化 7】



A-AC

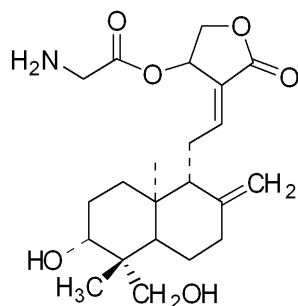
40

【0023】

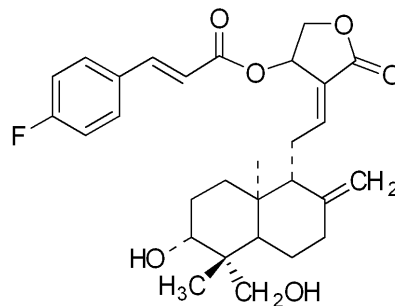
本発明提供したほかの化合物はAG, AF, ACI と ANOである。

【0024】

【化 8】

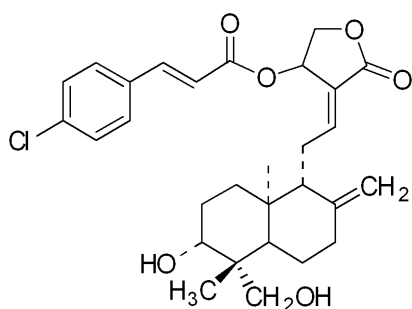


AG

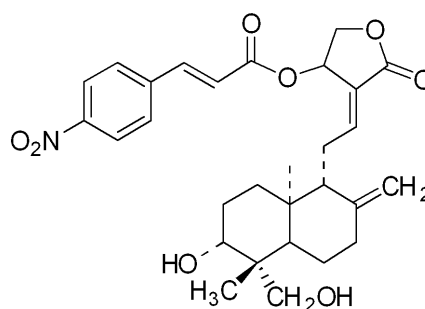


AF

10



ACI



ANO

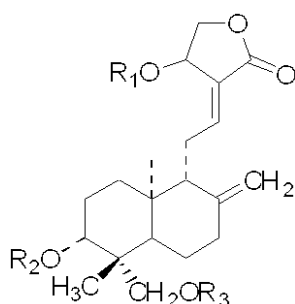
20

【0025】

本発明は一般式Iを有する化合物、或いはAG, AF, ACI, ANOの薬物、薬学的組成物及び細菌及びウイルス感染、炎症、癌、糖尿病など治療の働きに関するものである。この薬物、薬学的組成物は一般式Iを持っている化合物の一種、有効量のAG, AF, ACI, ANO、もしくはその薬学的に許容される塩を含む。

【0026】

【化 9】



I

30

【0027】

一般式 (I) 中、 R_1 、 R_2 、及び R_3 は同一でも異なってもよく、水素、置換或いは未置換の下記のラジカル：有機酸の酸基、例えば脂肪酸と芳香酸基、アセトキシ基、プロピオン基、酪酸基、マロン酸基、ピルビン酸基、ケイ皮酸基、コハク酸基、クエン酸基、乳酸基、グルコン酸基、リポ酸基、N-アセチルシステイン酸基、アミノ酸基、安息香酸基と無機酸の酸基例えば、硫酸基、硝酸基、りん酸基或いはその塩類：アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基等を含む、さらに、 R_1 、 R_2 、及び R_3 の少なくとも一つが(R)-リポ酸基、(S)-リポ酸基、又は両者の混合物、相応するジヒドロリポ酸 (dihydrolipoic acid)、N-アセチルシステイン (N-acetylcysteine) である。

40

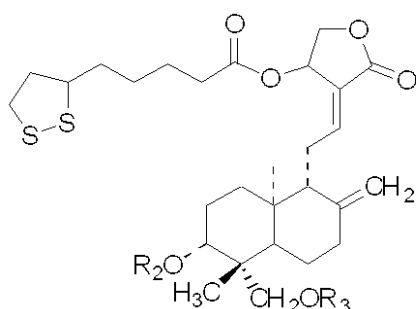
【0028】

本発明は一般式IIの化合物を有する薬物、薬学的組成物が細菌及びウイルス感染、炎症、癌、糖尿病など治療の働きに関するものである。この薬物、薬学的組成物は一般式Iを持っている化合物の一種の有効量の化合物もしくはその薬学的に許容される塩を含む。

50

【0029】

【化10】



II

10

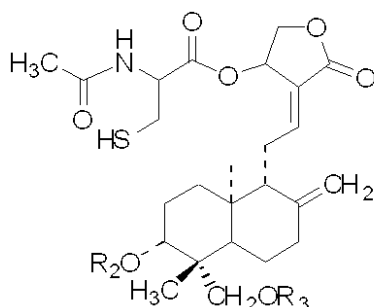
【0030】

この中、 R_2 と R_3 は同一でも異なってもよく、その上、独立に水素、置換或いは未置換下記のラジカルを示し：有機酸の酸基、例えば脂肪酸と芳香酸基、アセトキシ基、プロピオン基、酪酸基、マロン酸基、ピルビン酸基、ケイ皮酸基、コハク酸基、クエン酸基、乳酸基、グルコン酸基、リポ酸基、N-アセチルシステイン酸基、アミノ酸基、安息香酸基と無機酸の酸基例えば、硫酸基、硝酸基、りん酸基或いはその塩類：アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基等を含む。本発明は一般式IIIの化合物を有する薬物、薬学的組成物が細菌及びウイルス感染、炎症、癌、糖尿病など治療の働きに関するものである。この薬物、薬学的組成物は一般式IIIを持っている化合物の一種の有効量の化合物もしくははその薬学的に許容される塩を含む。

20

【0031】

【化11】



III

30

【0032】

この中、 R_2 と R_3 は同一でも異なってもよく、その上、独立に水素、置換或いは未置換下記のラジカルを示し：有機酸の酸基、例えば脂肪酸と芳香酸基、アセトキシ基、プロピオン基、酪酸基、マロン酸基、ピルビン酸基、ケイ皮酸基、コハク酸基、クエン酸基、乳酸基、グルコン酸基、リポ酸基、N-アセチルシステイン酸基、アミノ酸基、安息香酸基と無機酸の酸基例えば、硫酸基、硝酸基、りん酸基或いはその塩類：アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基等を含む。

【0033】

本発明はAG、ANOを有する薬物、薬学的組成物が細菌及びウイルス感染、炎症、癌、糖尿病など治療の働きに関するものである。有効量のAG 或いはANOと薬学的に許容される塩を含む。

40

【発明の効果】

【0034】

アンドログラフォライドはNF- κ Bを抑制することができる。NF- κ Bは腫瘍の発生、増殖、血管形成、転移に重要な働きを持っている。腫瘍の微環境はNF- κ Bの表現を誘導し、癌の耐薬性を誘導するため、多くの癌でNF- κ Bが高く表現される。アンドログラフォライドは細菌・ウイルス感染、炎症の抵抗、糖尿病の治療にも使われる。 α -リポ酸は有効な抗酸化剤、多種の疾病に治療作用を持っている。例えば、抗細菌・ウイルス感染、抗炎症、糖尿病治療及びその合併症。本発明の化合物はアンドログラフォライドと抗酸化剤(α -リポ酸)の接合体、多重作用のメカニズムと多種疾病に治療作用を持っている。これによっ

50

て、本発明提供するアンドログラフォライド誘導体は現有の物と違い、さらに優良な物である。

【0035】

本発明のアンドログラフォライド誘導体は抗癌薬と耐薬性腫瘍の治療に適する。抗微生物薬物として、細菌とウイルス感染薬物を含む。抗糖尿病薬物である。独特な構造を持っているため、抗菌、抗ウイルス、抗炎、抗腫瘍、抗糖尿病に限らず、多種の治療効能に備える。

【図面の簡単な説明】

【0036】

図1-1～1-8は、本発明アンドログラフォライド誘導体の細胞周期と細胞のアポトーシスの作用図である。

図2は、本発明アンドログラフォライド誘導体の緑膿菌成長への抑制作用図で、この中、Andro とAL-1の濃度は1 mMで、穿琥寧、炎琥寧と蓮必療それぞれの濃度は10 mMである。

図3は、本発明アンドログラフォライド誘導体の緑膿菌毒素分泌への抑制作用図で、この中、Andro とAL-1の濃度は1 mMで、穿琥寧、炎琥寧と蓮必療それぞれの濃度は10 mMである。

図4は、本発明アンドログラフォライド誘導体の細胞外プロテイナーゼ活性への抑制作用図で、この中、Andro とAL-1の濃度は1 mMで、穿琥寧、炎琥寧と蓮必療それぞれの濃度は10 mMである。

図5-1、5-2、5-3順番には無用薬グループ、Andro、AL-1の緑膿菌成長形態へ影響の電子顕微鏡写真で、この中、Andro、AL-1それぞれの濃度は1 mM である。

図6-1、6-2、6-3、6-4順番には無用薬グループ、Andro、穿琥寧、AL-1の緑膿菌早期BF形成へ影響の電子顕微鏡写真で、この中、Andro、AL-1それぞれの濃度は1 mM 、穿琥寧の濃度は10 mM である。

図7-1、7-2、7-3、7-4順番には無用薬グループ、Andro、穿琥寧、AL-1の緑膿菌の成熟BF形成へ影響の電子顕微鏡写真で、この中、Andro、AL-1それぞれの濃度は1 mM 、穿琥寧の濃度は10 mM である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

・ 定義

本書の術語：“有機酸”は飽和と未飽和の脂肪酸、芳香酸である。その中、脂肪酸はアルキル基、アルケニル基、アルキニル基脂肪酸を含むが、これに限らない。

【0038】

本書使用する術語：“アルキル基”は未置換され又は置換された直鎖、側鎖又は15個炭素鎖まで含有する環形アルキル基である。直鎖アルキル基はメチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-アミル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル等が挙げられている。シクロアルキルの例として、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等が挙げられている。アルキル基は一つ、又は幾つの置換基に置換され得る。前記置換基の非限定例は、 NH_2 、 NO_2 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 ONO_2 、F、Cl、Br、I、OH、 OCH_3 、 CO_2H 、 CO_2CH_3 、CN、アリール基、ヘテロアリール基等が挙げられている。術語“アルキル基”は又、未置換され又は置換される直鎖、側鎖又は15個炭素鎖まで、鎖には最低一つのヘテロ原子(例えば、窒素、酸素又は硫黄原子)を含有するアルキル基も指す。前記のアルキル基の例として、例えば $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ と $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 等、側鎖ラジカルは $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ 、 $\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCH}_3$ と $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{S}$ 等が挙げられる。前記のシクロラジカルは、一つ、又は幾つの置換基に置換され得る。置換基の非限定例は NH_2 、 NO_2 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 ONO_2 、F、Cl、Br、I、OH、 OCH_3 、 CO_2H 、 CO_2CH_3 、CN、アリール基、ヘテロアリール基等が挙げられる。

【0039】

本書使用する術語“アリール基”は未置換され或いは置換されたアリール基化合物、炭

素ラジカルとヘテロアリール基である。アリール基は単環、又は多環粘稠化合物。例えば、ベンゼンは単環アリール基、ナフタリンは多環粘稠化合物である。アリール基は一個、又は幾つの置換基に置換されることができる。置換基の非限定例として、 NH_2 、 NO_2 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 ONO_2 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 OH 、 OCH_3 、 CO_2H 、 CO_2CH_3 、 CN 、アリール基、ヘテロアリール基が挙げられる。

【0040】

ヘテロアリール基は置換或いは未置換され単環又は多環ラジカルに関する。環内は最低でも一つのヘテロ原子(窒素、酸素又は硫黄原子硫等)を有する。典型のヘテロ環ラジカルは一個、又はそれ以上の窒素原子を含んでいる。例えば、テトラゾリル、ピロールピリル、ピリジン(例えば4-ピリジン、3-ピリジン、2-ピリジン)、ピラジン、インドキシル、キノリン(例えば2-キノリン、3-キノリン)、イミダゾール、イソキノリン、ビーラゾール、ピラジン、プリミジン、ビリドン等の誘導体。典型一個の酸素原子を含む2-フラン、3-フラン或いはベンゾフラン、硫黄原子を含むチオフェン、ベンゾチオフェン、代表的なヘテロ環ラジカルはフラザニル、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、フェノチオキシンが例示される。ヘテロ環ラジカルは一個又はそれ以上の置換基に置換され得る。例えば、 NH_2 、 NO_2 、 O -アルキル基、 NH -アルキル基、 $\text{N}(\text{アルキル})_2$ 、 $\text{NHC}(\text{O})$ -アルキル基、 ONO_2 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 OH 、 OCF_3 、 OSO_2CH_3 、 CO_2H 、 CO_2 -アルキル基、 CN 及びアリール基と多アリール基。環内ヘテロ原子が酸化され、 N -酸化物、ケトン、スルホンに形成する等も含む。

【0041】

本書使用する“薬学的に許容される”とは、化合物、例えば塩又は賦形剤に受けられない毒性はないである。薬学的に受ける塩は無機アニオン、例えば塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオン、硫酸ラジカル、亜硫酸ラジカル、硝酸ラジカル、亜硝酸ラジカル、リン酸ラジカル等。有機アニオンはラジカル、ピルビン酸ラジカル、プロピオン酸ラジカル、ケイ皮酸ラジカル、トルエンスルホン酸ラジカル、クエン酸ラジカル、乳酸ラジカル、ブドウ糖酸ラジカル、グルコン酸ラジカル等が挙げられる。薬学的に受ける賦形剤は後に記載がある。E. W. Martin, in Remington's Pharmaceutical Sciences Mack Publishing Company (1995), Philadelphia, PA, 19th ed に参照。

【0042】

本書使用する術語“アミノ酸”は天然と非天然アミノ酸で、その中、24種の天然アミノ酸はアラニン、アルギニン、L-アスパラギナーゼ、アスパラギン酸、シトルリン、システイン、シスチン、Gln-グルタミン、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ヒドロキシプロリン、ロイシン、イソロイシン、リジン、メチオニン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロジン、バリン等を含む。非天然アミノ酸は：2-フルオロ-L-フェニルアラニン、3-フルオロ-L-フェニルアラニン、4-フルオロ-L-フェニルアラニン、2-クロロフェニルアラニン、3-クロロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、2,4-クロロ-L-フェニルアラニン、3,4-クロロ-L-フェニルアラニン、2-ブromoフェニルアラニン、4-ブromoフェニルアラニン、4-ヨードフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、2-メチルフェニルアラニン、3-メチルフェニルアラニン、4-フェニルアラニン、2-シアノフェニルアラニン、3-シアノフェニルアラニン、4-シアノフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、3-(2-ピリジン)アラニン、3-(3-ピリジン)アラニン、3-(4-ピリジン)アラニン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、2-フランアラニン、3-3ジフェニルアラニン、3-ベンゾチオフェンアラニン、2-チオフェンアラニン、3-チオフェンアラニン、スチレンアラニン、2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニルアラニン、1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-イソキニーネ-3-ヒドロキシ酸、1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-βカルボリン-3ヒドロキシ等を含む。

【0043】

術語“有効用量”は哺乳動物の疾病を抑制に薬物の投与量である。

【0044】

独特の構造を持つため、本発明の化合物は抗菌、抗ウイルス、抗炎症、抗腫瘍、抗糖尿病に限らず、多種の治療効力に備える。

【0045】

2、アンドログラフォライドの抗菌活性の研究

アンドログラフィスの抽出物で副鼻腔炎併発上部呼吸器感染を治療する、その結果、プラセボより治療効果が顕著で、頭痛、鼻、喉と全身の痛みが著しく緩和させ、治療組の体温が穏やかに下降する。(Caceres et al., *Phytomedicine* 1997, 4, 101-104)。ある250名の被験者を持つ実験に、アンドログラフィス抽出物は顕著に風邪の治療時間を短縮し、病状を軽くさせる。(Hancke et al., *Phytother. Res.* 1995, 9, 559-5621; Melchior et al. *Phytomedicine* 1996, 3, 314-318; Caceres et al., *Phytomedicine* 1999, 6, 217-223)。ある107名18歳の学生を対象とする実験に、毎日被験者に100 mg、5.6%のアンドログラフィス抽出物含有する錠剤を2枚を投与する。この投与量は遙かに臨床風邪治療アンドログラフィスの投与量(一日1,200~6,000 mg)に少ないである。3ヶ月を投与し、他の53名の被験者にプラセボを投与する。結果には、アンドログラフィスを投与するグループは16人が風邪に引き、プラセボを投与グループは33人が風邪を引いた。アンドログラフィスが風邪のリスクを減少することを示す。(Caceres et al., *Phytomedicine* 1997, 4, 101-104)。

【0046】

アンドログラフォライドは広く臨床に使われるが、実験により、直接の殺菌効果はないと証明される。(Singha et al., *Fitoterapia* 2003, 74, 692-694; Li et al., *China J. Chinese Materia Medica* 2006, 12, 1015-1017; Xia et al., *J. Immunol.* 2004, 173, 4207-4017)。最近、Li 等が(*China J. Chinese Materia Medica* 2006, 12, 1015-1017) アンドログラフォライド・ラクトン誘導体(蓮必治)は直接に緑膿菌(PA01)の成長を阻害できないが、顕著にそのQSシステムを抑制ことができる。蓮必治12.5 mg/mL (34 mM)は培養するPA01の成長に影響がないが、顕著にピオシアニンの形成及びタンパク分解酵素、エラスターゼの活性を阻害できる。このメカニズムの発見は一部分にその抗菌効果を釈明する。

【0047】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA)、略称は金葡菌、グラム陽性菌の一種である。よく健常者の鼻腔に付着する。統計により、世界中約十億人が各種サブセットの黄色ブドウ球菌を保有する(Ryan et al., *Sherris Medical Microbiology* 2004, 4th ed., McGraw Hill)。黄色ブドウ球菌による感染はよく見る皮膚感染症の一種である。浅膿腫に増殖することにより、重く感染を起こし、顔面を傷つけ、他の命を脅かす疾病を起こすことがある。例えば、内膜炎、肺炎、骨髓炎、膿毒性関節炎、脳(髄)膜炎及び手術後傷口感染、敗血症、毒素性ショック症候群等。(Silverstein et al., *Infect. Immun.* 1994, 62, 152-161; Dann et al., *Clin. Inf. Dis.* 1994, 18, 437-439; Wisplinghoff et al., *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2003, 22, 686-691; Karlowsky et al., *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2004, 3, 7-15)。

【0048】

抗生物質の広く応用に連れて、黄色ブドウ球菌の耐薬性も一層に強くなる。MRSAは耐抗生物質黄色ブドウ球菌の一種で、 β -ラクタム系を含有する抗生物質に耐薬性を持つ。例えば、メチシリンとよく使われる抗生物質オキサシリン、ペニシリン。最近の研究に、アメリカ合衆国で、20%の静脈注射による黄色ブドウ球菌感染患者はMRSA感染 (Graham et al., *Ann. Intern. Med.* 2006, 144, 318-325)である。

【0049】

現在、重い耐薬黄色ブドウ球菌を感染する患者に、有効な抗生物質はバンコマイシンとテイコブラニンしかない。テイコブラニンはバンコマイシンの同源誘導体である。内服に吸収率が悪いため、全身感染には静脈注射が必要である。更に嚴重なのが、バンコマイシンとテイコブラニンに耐薬性を持つ耐薬黄色ブドウ球菌(VISA) (Schito et al., *Clin. Microbiol. Infect.* 12 Suppl. 2006, 1, 3-8)。が発見される。

【0050】

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA)はグラム陰性菌、一種の条件致病菌である。緑膿菌はよく肺、尿道、火傷に感染、血感染(Stover et al., *Nature* 2000, 406, 959-964; Lyczak et al., *Microbes. Infect.* 2000, 2, 1051-1060)。を起こすこともある。嚢胞性線維症患者に慢性肺感染を起こす主要な病原菌で、(Frederiksen et al., *Pediatr. Pulmonol.* 1997, 23, 330-335),最近、傷口長期感染を起こす主要病因と考えられる。(Bjarnsholt et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 409-414)。

【0051】

細菌は表面に付着、自体が生み出すポリマー基質に群落を形成、バイオフィームと言われる。(Costerton et al., *Science* 1999, 284, 1318-1322)。緑膿菌はよく自身でバイオフィームを形成し、適している実験環境で、厚さ何百ミリメートルの菌膜を形成できる。このバイオフィームに存在する細菌は抗生物質に抵抗作用を持っている。肺緑膿菌感染患者には、嚢胞性線維症患者は特にバイオフィームをターゲットスポットとする治療法に適する。

10

【0052】

クオラムセンシング(quorum sensing, QS)とは、一部の生物は細胞間の情報伝達により、形成する生息の密度のこと。細菌細胞はオートインデューサー(autoinducers, AIs)の産生と放出により、遺伝子の示すと細胞群落の配列(バイオフィームの形成)を調整する。

【0053】

(Fuqua et al., *Curr. Opin. Microbiol.* 1998, 1, 183-189; Hammer et al., *N. (Engl) J. Med.* 1996, 35, 1081-1090)。QSシステムは細菌の密度が宿主を圧倒れるに増大した後、大量に増殖し、病症を起こすことが考えられる。

20

【0054】

グラム陰性菌のアシル化ホモセリンラクトンはよく研究されるクオラムセンシングである。細菌間のコミュニは微生物学に属するが、AHLsは植物、動物、人間の疾病にも重要である。このシステムは*V. fischeri*ビブリオの発光システムから発現された。(Eberhard et al., *Biochem.* 1981, 20, 2444-2449; Nealson et al., *J Bacteriol.* 1970, 104, 300-306)。*V. fischeri*ビブリオは二種の蛋白-AI合成酵素Lux IとLux Rを含有する。Lux IとLux RはAIに発光を調節される転写制御因子である。AHL合成酵素産生するAHL因子はアシル化ホモセリンラクトン(S-アデメチオニンから)は変化できるアシル・チェン(脂質代謝から)が同行し、アシル・リンケージより繋がる。AHLsは4-18個炭素原子を含有するアシル・チェンで、酸化状態と不飽和度より変化する。(Fuqua et al., *Curr. Opin. Microbiol.* 1998, 1, 183-189)。

30

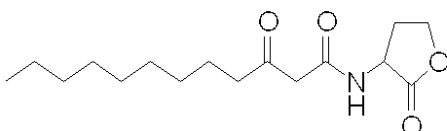
【0055】

緑膿菌の中から、二つのAHL感知経路を発見された。Lasシステムは、3-オキシラウロイル・ホモセリンラクトンを合成するAHL合成酵素因子とLuxRコード型転写制御子蛋白因子LasIからなっている (Gambello et al., *J.Bacteriol.* 1991, 173, 3000-3009; Zhao et al., *Chin. Med. J. (Engl)* 1991, 104, 770-775)。Lasシステムは致病因子の発現を制御することが研究から示した。細胞外酵素、(LasB elastase, LasA protease, alkaline protease)二次代謝物質(pyocyanin, hydrogen cyanide, pyoverdine)、毒素(exotoxin A)とLasI自体を含む。Rhlシステムで、ブチルホモセリンラクトン(C₄-HSL)の合成はrhlI因子によって決まる。rhlI因子とrhlR因子産物は一緒にrhlABフムノース合成因子の転写を活性化させる。RhlシステムはLasシステムに制御される致病因子の発現も調節する。3-オキシラウロイル・ホモセリンラクトンの構造式は以下である。

40

【0056】

【化12】



50

【0057】

緑膿菌クオラムセンシングモデルは：細菌密度が低い状態では、基本レベルの3-オキソラウロイル・ホモセリンラクトンを産生する。細菌密度が高く、3-オキソラウロイル・ホモセリンラクトンは臨界密度になると、LasRと反応し、LasR-3-oxo-C₁₂-HSL複合物を形成、多くの因子転写を促進する。これらの因子が発現し、細胞外酵素、二次代謝物質毒素等の致病因子を産生する。

【0058】

細菌は集団行動の因子発現制御に、クオラムセンシングは有効なメカニズムと認められる。この20年クオラムセンシングの研究により、新しい抗菌薬物の開発に、感知経路の研究は楽観的な方向と示している。

10

【0059】

アンドログラフォライド及びその3種の誘導体穿琥寧、炎琥寧、蓮必治は炎症、発熱、細菌及びウイルス感染性疾患の臨床症状を軽減させられる。(Hendrickson et al., J. Bacteriol. 2001, 183, 7126-7134; Zhang et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2000, 27, 358-368; Shen et al., Br. J. Pharmacol. 2002, 35, 399-406; Gabrielian et al., Phytomedicine 2002, 9, 589-597)。天然の漢方薬で治療効果も目覚ましく、“緑色抗生物質”と言われる。

【0060】

アンドログラフォライドの解熱、抗炎効能

アンドログラフォライドは2-4ジニトロフェノール、又は内毒素で起こす発熱、蛋白で起こす水腫或いはハズ油で引き起こす炎症に解熱、抗炎活性を持つ。肺炎双球菌と溶血性乙型連鎖球菌で引き起こす体温上昇を抑制、軽減でき、チフス、パラチフスワクチンで起こす発熱ウサギ又は2-4ジニトロフェノールで起こす発熱ラットに一定の解熱効能がある。肺炎双球菌と溶血性乙型連鎖球菌を感染するウサギに対し体温上昇時間を遅らせ、上昇程度を落せる。ラットに30、100、300 mg/kg アンドログラフォライドを内服させると、顕著にカラゲニン、カオリン、ニスタチンで起こすの足水腫抑制できる。、棉球で起こす肉芽腫を抑制、補助剤で関節炎起こす水腫を軽減できる。アンドログラフォライド(300 mg/kg)は血管透過性実験で酢酸で起こす染料の浸透を抑制できる。(Han et al., The Chinese J. Modern Applied Pharmacy 2005, 22, 126 -129)。Chiou等(Br. J. Pharmacol. 2000, 129, 1553-1560)の研究でアンドログラフォライド(1-100 mM)はRAW264.7細胞の中で誘導型NO合成酵素(iNOS)の蛋白発現を下げるにより、NOの合成を抑制する。蛋白の新規合成を阻害し、加速デグラデーションにより蛋白の安定性を下げる。。Batkhuu等(Biol. Pharm. Bul. 2002, 25, 1169-1174)の結果はアンドログラフォライドがNOの産生を制御し、0.1-100 mMでの範囲で濃度依存性を示し、IC₅₀は7.9 mMである。

20

30

【0061】

炎症反応で、粘着分子発現の上昇と内皮 - 白血球の増殖は炎症発展の重要段階である。誘導剤腫瘍壊死因子α (TNF-α)は内皮細胞粘着分子(ICAM-1)発現の増加により、内皮 - 白血球の粘着を強化する。内皮Eahy926細胞とTNF-α (0.5 ng/ml)を18 hに接触培養後、粘着率は15倍を上げる。当時にアンドログラフォライド (0.6-16.7) mg/mlを投与すると、TNF-αから起こす粘着増加を軽減できる。ICAM-1発現への影響実験の中で、アンドログラフォライド (0.6-16.7) mg/mlは剂量依存性にTNF-αから起こすICAM-1の発現上昇を抑制できると発見された。アンドログラフォライドが好中球により炎症を抑制するメカニズムはPKC依存経路を調節、活性酸素の産生を阻害、又は部分阻害し、ラクトンにMac-1の高く発現を下がらせるとShen等(Br. J. Pharmacol. 2002, 135, 399-406)が解き明かした。

40

【0062】

Tsai等が(Euro. J. Pharmacol. 2004, 498, 45-52) アンドログラフォライドは体外補体5α (C5α)から起こす大食細胞補足抗炎メカニズムについて評価した。アンドログラフォライドは用量依存性を示し、細胞分裂を抑制する。IC₅₀は5.6 ± 0.7 μMである。細胞外シグナル制御キナーゼ1/2(ERK1/2)、P38分裂促進因子を活性化させる蛋白質キナーゼ (

50

P38MAPK)とホスファチジルイノシトール-3-キナーゼはC5 α 分裂を起こすに必要で、c-Jun N-末端キナーゼ(JNK)が必要ではない。アンドログラフォライドはC5 α 刺激するERK1/2及びその上流活性剤MAPキナーゼ-ERKキナーゼ(MEK1/2)のリン酸化作用を顕著に弱められる。同じ条件で、アンドログラフォライドはC5 α 刺激するP38MAPKとJNKのリン酸化に阻害できない。アンドログラフォライドもC5 α 刺激する下流PI3Kターゲット蛋白AKTのリン酸化を阻害できる。このため、アンドログラフォライドの抗炎メカニズムはERK1/2とPI3K/Aktの情報経路への細胞分裂抑制作用である可能性がある。

【0063】

Xia(J. Immunol. 2004, 173, 4207-4217)の研究でアンドログラフォライドが細胞核中の転写因子(NF-kappaB)の活性を抑制できることが発見された。関連メカニズムの研究でアンドログラフォライドはp50の還元システイン(62)と共有結合化合物を形成し、NF-kappaBオリゴヌクレオチドと核蛋白の繋がりを阻害する。アンドログラフォライドは内皮細胞NF-kappaBの活性を抑え、更に細胞粘着分子E-セレクトイン(E-selectin)の発現を下げる。そのうえ、E-selectin媒介の白血球の粘着を阻害し、細胞因子と内毒素で起こす好中球の腹膜沈着を除去し、敗血症ショックを軽減させ、体内変態反応関節炎を阻害する。IkappaB alphaデグラデーション、p50とp65の核転位、細胞の成長速度に抑制効能は無い。Hidalgoたち(Br. J. Pharmacol. 2005, 144, 680-686)がアンドログラフォライドの抗炎メカニズムに関する研究はアンドログラフォライドが一部の前炎症蛋白の発現を阻害し、これらの蛋白が遺伝子の中でNF-kappaBサイトを繋がることを示す。著者はアンドログラフォライドが好中球HL260中の血小板活性化因子PAFとN-ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン(fMLP)起こすNF-kappaBに分裂する活性化作用の働きを分析した。アンドログラフォライドがNF-kappaBとDNAの繋がりを抑制により、抗炎の働きを発揮し、前炎症蛋白、例えばCOX-2の発現を下げる。

【0064】

アンドログラフォライドの心血管への影響

Chenたちは(Biochem. Pharmacol. 2004, 67, 1337-1345)アンドログラフォライドが臍静脈内皮細胞(HUVES-VCs)を生長因子欠乏(GF)で起こす分子衰亡と情報経路を保護することを調査した。HUVESVCsがGFを欠乏18h後衰亡したが、アンドログラフォライドを投与すると、衰亡を抑制でき、用量依存性も示す(1-100 mM)。アンドログラフォライドは細胞色素Cが細胞質へ入ることを抑制、ミトコンドリアのポテンシャルエネルギーを弱めるにより、caspase-3と-9を活性化を阻害し、衰亡したミトコンドリア経路を抑制する。アンドログラフォライドは内皮細胞を処理し、一つ抗衰亡信号蛋白キナーゼAktを活性化、一つ下流ターゲットBADリン酸化を起こさせる。アンドログラフォライドはHUVES-VCsでAkt-BADの経路を活性化させにより、抗衰亡作用を発揮する。粥状動脈硬化の予備治療剤として使用できる。

【0065】

アンドログラフォライドの保肝効能

ガラクトサミンを投与する48, 24, 2h前、又はアセトアミノフェンを投与する1, 4, 7h後、(50, 100, 200, 400 mg/kg)用量のアンドログラフォライドを投与すると、ガラクトサミンとアセトアミノフェンで起こすアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アラニンアミノ基転移酵素(ALT)、アルカリ性リン酸酵素、ビリルビン、トリアシルグリセロールの濃度が全部抑制させ、基礎レベルに回復する。アンドログラフォライドは四塩化炭素起こすラット肝損傷を抵抗できる。アンドログラフォライド(5.0と10 mg/kg, p.o.)はラット肝微粒体アニリン水酸化酵素、N-脱メチル化酵素、O-脱メチル化酵素活性を抑制でき、特に、O-脱メチル化酵素に敏感する。Visenたちの(J. Ethnopharmacol. 1993. 40, 131-136)研究で、アンドログラフォライドが顕著の用量依存性保肝活性(0.75-12 mg/kg, p.o.)を示し、アセトアミノフェン起こす体外分離で取ったラット肝細胞毒性に対し、アンドログラフォライドは顕著に肝細胞存活率を向上させ、血清、分離した肝細胞中の酵素(GOT, GPTとアルカリ性リン酸酵素)への毒性を完全に抑制、シリマリン(臨床応用保肝薬物)より効果が顕著である。

【0066】

アンドログラフォライドの降血糖効能

糖尿病 (Diabetes Mellitus, DM) は遺伝要素、環境要素にも関わり慢性全身性疾病で、体内インスリン分泌量が相対、又は絶対不足で糖、脂肪、蛋白質の代謝乱れになる。インスリン依存型糖尿病(I型、IDDM)とインスリン非依存型(II型、NIDDM)二種類があり、II型は80%以上占めている。

【0067】

臨床よく使われる糖尿病治療薬物は作用メカニズムより、インスリン分泌促進剤（スルフォニル尿素薬：グリベンクラミド、グリビジト等）；インスリン作用増強薬（ビグアナイド類薬：フェンホルミン、メルビン等）； α グルコシダーゼ阻害薬（アカルボース、ボグリボース）、及びインスリン分泌促進薬、グルコース代謝、利用促進薬。今までの臨床使用、使用しようとする血糖降下薬には、各種の西洋薬（western medicines）が一定の限定性、不良反応があり、重く不良反応さえもある。低血糖、乳酸性中毒、長期に使用と合併症を起こす。例えば、スルフォニル尿素薬の副作用は低血糖、ビグアナイド類薬は乳酸性中毒を起こす可能性がある。II型糖尿病の治療には、スルフォニル尿素薬とビグアナイド類内服降血糖薬の治療効果が有限で、膵臓 β 細胞一層の衰亡を抑制できなく、インスリン依存性を引き起こす。最近の研究で、中薬が糖尿病に顕著な治療効果を持つことが発見された。一部の中薬は前記西薬の降血糖効能に備えるうえ、膵臓 β 細胞に保護作用があり、血流動力学を改善し、糖尿病合併症の発病率を下げ、末梢と根本をともに治療する効果を達成する。（李津，劉亜明 山西中医学院学报，2006，7(3):49-51）

糖尿病の発生、発展で、高糖環境、NF- κ B活性化、酸化ストレス、炎症、 β 細胞衰亡及び糖尿病合併症の間に、複雑なかかわりがある。

【0068】

糖尿病高糖環境はNF- κ Bを活性化させる。Sakikoが(Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2007, 292, 1141-1150) 高糖環境で糸球体内皮細胞ICAM-1の発現を促進、NF- κ Bを活性化させると発見した。この変化ピオグリタゾン等の抑制剤で阻害できる。Pieperたちが (J. Cardiovasc. Pharmacol. 1997, 30, 528-532) 違っている濃度の高糖と内皮細胞を一緒に培養し、電気泳動移動度シフト解析 (EMSA)でNF- κ B活性が上昇と検出、NF- κ Bの抑制物SN250を入れると、活性の上昇を阻害できる。

【0069】

酸化ストレスはNF- κ Bを活性化させる。長期に高糖環境で存在する細胞に対して、核酸と脂類が酸化され、最終に終末糖化産物(AGE)を形成する。逆に、その受容体(RAGE)と結合し、細胞の効能に影響する。Mohamed たちの(Biofactors, 1999, 10, 157-67)研究に、AGEが体内、体外で細胞内の酸化ストレスを増やし、更にNF- κ Bを活性化させる。糖尿病患者で、NF- κ Bの活性化と血糖の制御に関わり、抗酸化剤 α -アルファルリボ酸に弱められることが発見された。ネズミと人体膵臓細胞の情報により、NF- κ Bの活性化はiNOSの発現を促進でき、膵臓 β 細胞損害を引き起こす。(Mohamed A. K, et al. Biofactors, 1999, 10, 157-167)。Hofmann (Diabetologia. 1999, 42, 222-232) が観察43 例I 型糖尿病人体外分離した末梢血単核細胞中のNF- κ B活性を観察し、10個を事前に二週間で抗酸化剤 α -アルファルリボ酸の治療を受ける。結果は、ヘモグロビン・エィワンシー(HbA1c)水準>10%の患者のNF- κ B活性化が顕著に高まった。NF- κ B活性の向上が血漿脂質過酸化物の増加に関わる。 α -アルファルリボ酸で使用した患者のNF- κ B結合活性が下げる。これにより、高血糖は糖尿病患者の血液単核細胞NF- κ Bを活性化させ、NF- κ Bの活性化が一定の程度に酸化ストレスに依存する。

【0070】

NF- κ Bは膵臓 β 細胞の衰亡を制御する。NF- κ Bは多くの膵臓細胞効能損害を起こす炎症促進因子の発現を制御している。例えば、NF- κ BはFasとiNOS、COX-2の発現を誘導により、T細胞媒介の殺傷作用と β 細胞毒性産生を促進する。また、 β 細胞内他の炎症促進因子、例えば走化因子(MCAP-1等)、粘着分子(ICAM-1等)のプロモーターにNF- κ Bの結合序列(May and Ghosh, Immunol. Today 1998,19, 80-88)。が持っている。NF- κ Bの β 細胞炎症反

応への重要性が、体外NF- κ B抑制モデルにも実証された。

【0071】

NF- κ B活性の抑制より、 β 細胞の衰亡を抑制できる。Stephens (J. Autoimmun. 1997, 10, 293-298) たちがTNFでNIT-1膵臓 β 細胞を刺激する。NF- κ B活性の抑制より、 β 細胞中免疫媒介の幾種細胞の死亡経路を抑制することが発見した。このメカニズムは自体免疫性糖尿病に膵臓 β 細胞を保護する有効な方法と成り得る。

【0072】

抗酸化剤は膵臓 β 細胞を保護できる。誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)触媒し産生するNOは細胞因子媒介の β 細胞損害及び効能異常の潜在媒介である。反応性酸化物(ROS)は β 細胞の死亡と糖尿病の形成に関わることがもう実証された。Ho (Free Radical Biology Med. 2000, 28, 604-624) たちはROSの除去剤と安定剤PBNでalloxanとSTZより起こす糖尿病ネズミを実験する。結果発見注射alloxanとSTZを注射する30分間あと、膵臓のNF- κ Bを活性化させられ、事前にPBN使用すると、NF- κ Bの活性化を抑制でき、有効に血糖を下げられると発見する。 10

【0073】

NF- κ B活性化と糖尿病合併症

血管病変は糖尿病の主要合併症で、患者を障害させる主要な原因である。終末糖化産物(AGEs)は糖尿病血管合併症の形成を促進することも合意された。Schmidtが(J. Clin. Invest. 1995, 96, 1395-1403) 糖尿病患者の血清から分離したAGEsが血管内皮細胞を粘着分子VCAM-1発現を誘導でき、誘導メカニズムはNF- κ Bの活性化に関わり、AGEs起こらせる酸化ストレスもNF- κ Bを活性化させられると報道した。糖尿病性網膜症と腎症は失明、腎臓衰弱の主要原因である。Romeoたち(Diabetes. 1999, 48 (Suppl), 154)は単体クローン抗体免疫組織化学法により、13例検死する糖尿病患者と14例年齢、性別相応する非糖尿病患者網膜微血管細胞の衰亡状況、無細胞毛細血管の発生率を比較した。結果として、糖尿病組が大量なNF- κ Bより起こす外膜細胞を持ち、内皮細胞と外膜細胞の衰亡、無細胞毛細血管も増加し、糖尿病患者網膜外膜細胞を提示するNF- κ Bの活性化は糖尿病網膜の早期損害を起こす可能と示す。Hofmann (Diabetologia. 1999, 42, 222-232)が33例の患者を観察し、その中21例が糖尿病腎合併症である。糖尿病患者末梢血単核細胞のNF- κ B活性化が上昇、活性化させたNF- κ B p65の免疫組織化学染色も強くなり、NF- κ B活性と尿微量白蛋白のレベル、血漿血拴制御蛋白の濃度に正比例である。 20 30

【0074】

ここまでをまとめると、糖尿病の高糖環境と酸化ストレスはNF- κ Bを活性化させられ、NF- κ B活性化に起こらせる炎症反応、酸かストレスの酸素フリーラジカルは膵臓細胞を衰亡、壊死させ、糖尿病の発病を起こす。また、糖尿病合併症血管病変、網膜病変、腎臓損害度もNF- κ Bの活性化に正比例関係と発見する。これによって、有効なNF- κ B抑制剤、抗酸化剤を探せ、膵臓 β 細胞を保護、糖尿病合併症の発生を抑制、根本的に治療の目的を達することは、糖尿病治療の新しい戦略に成り得る。

【0075】

アンドログラフォライドは顕著に糖尿病を患うラットの血糖水準を下げる。Zhang とFrei (ASEB J. 2001, 15, 2423-2432) は正常とSTZ誘導する糖尿病ラットに対し、アンドログラフィスエタノール抽出物の治療作用を研究し、アンドログラフィスエチルアルコール抽出物を内服すると、用量依存に糖尿病ラットの血糖水準を下げられ、内服量は400 mg/kgになると、治療効果はメルビン(500 mg/kg, 内服)と同じで、正常ラットの血糖に影響はないと発見した。。 40

【0076】

長期の実験で、アンドログラフィスエタノール抽出物400 mg/kg 或いはメルビン500 mg/kg、一日二回内服、14日間連続投与する。アンドログラフィス、メルビンを投与するラットは体重が顕著に増やし、摂食、飲水量が減らした正常ラットに影響はない。糖尿病ラットにインスリン水準はあまり相違はないことより、アンドログラフィスの降糖作用はインスリンに関わらないと実証する。アンドログラフィス治療ラットは腎臓グルコース-6リ 50

ン酸酵素(G-6-Pase)活性が顕著に下がり、グルコースの増加に関わると推定する。また、降糖以外、アンドログラフィスエタノール抽出物は抗酸化ストレス効能もあり、糖尿病ラット肝臓、腎臓のスーパー・オキシド・ジスムターゼ(SOD)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、還元型グルタチオン(GSH)含有量を増やす、脂質過酸化反応生成物(MDA)を減少させる。酸化ストレスは重要な糖尿病合併症発病要素で、これにより、アンドログラフィスは血糖合併症の発生、組織損害程度を抑制できると推定する。同様に、Rao (Iranian J. Pharmacol. Ther. 2006, 5, 47-45)はalloxan誘導する糖尿病ラットモデルに対し、アンドログラフィスクロロフォルム抽出物が(300 mg/kg、内服)降血糖、保腎活性を持ち、有効に蛋白尿、尿毒症の発生を抑制できると発見する。Yuたち (Planta Med. 2003, 69, 1075-1079)はアンドログラフォライド (1.5 mg/kg、内服)が正常ラットに対する静脈グルコース刺激実験とSTZ誘導する糖尿病ラット血糖上昇に顕著の抑制働きがあると報道した。

10

【0077】

対外ヒラメ筋ブドウ糖摂取実験でアンドログラフォライドが放射性ブドウ糖の摂取を増やし、さらに4型ブドウ糖輸送体(GLUT4)の発現を増加させることに関わると実証する。ブドウ糖輸送体は細胞膜を通し輸送の媒介である。早期研究で、糖尿病患者がGLUT4因子の発現が減少と発見した。(Sivitz Wi, et al. Nature 1989, 340, 72-74)。

【0078】

アンドログラフォライドの抗腫瘍効能

Nanduriたち(アメリカ合衆国特許 US 6486196, 2002; Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 4711-4717)の研究で、8, 17-エポキシ化アンドログラフォライドがラクトンの毒性と維持し、これによって取ったエステル化誘導体は活性を一層に上昇させると示す。体外実験IC₅₀(5-15 μ M)のアンドログラフォライドが多種の人体腫瘍細胞に活性を持っている。(Satyanarayana et al., BMC Cancer 2003, 4, 26-34)。Rajagopaたち(J. Exp. Ther. Oncol. 2003, 3, 147-158)の研究で、アンドログラフォライドは多種の腫瘍細胞の増殖を抑制できると示す。直接作用は誘導周期抑制蛋白P27により、CDK4の発現を下げ、周期をG₀-G₁に停滞させ、リンパ細胞の増殖とIL-2分泌によって免疫作用を刺激する。アンドログラフォライドはTNF- α の産生とCD4の発現で腫瘍細胞に対しリンパ細胞の毒性を起こし、これが抗腫瘍性の間接原因でありうる。

20

【0079】

アンドログラフォライドは細胞周期をG₀-G₁期に停滞させ、細胞周期抑制蛋白p27の産生を誘導し、細胞周期が依存する蛋白キナーゼ4 (CDK4)の発現を抑制する。アンドログラフォライドの細胞周期への影響はフローサイトメトリー法とウエスタンブロット解析法を使用する(Rajagopal et al., J. Exp. Ther. Oncol. 2003, 3, 147-158)。MCF-7細胞に対し、5 μ Mアンドログラフォライド使用、24時間後、48時間後、DMSO対照細胞と対比すると、アンドログラフォライドを使用する細胞が24時間後、G₁期細胞が10%増殖し、S期とG₂/M期細胞比率の下降につれて、細胞周期はG₁期に停滞すると示す。48時間後、対照群に比べて、G₁期の細胞比率が下がり、S期とG₂-M期細胞数が変化しなく、次G₁期のMCF-7が7%増殖する。アンドログラフォライドを使用する24時間後、誘導細胞がG₁期に停滞し、更にすると、G₁期の細胞が衰亡する。衰亡特徴を示す次G₁期細胞の増殖は顕著な証拠である。

30

40

【0080】

体内実験の結果はアンドログラフォライドはメラノーマ(B16F0)と結腸癌(HT-29)移植モデルに抵抗効能を持つと示す。(Rajagopal et al., J. Exp. Ther. Oncol. 2003, 3, 147-158)。Satyanarayana等(Satyanarayana et al., BMC Cancer 2003, 4, 26-34)ホロファイバーを使用、MCF-7乳腺癌モウスに対し、アンドログラフォライドの抗腫瘍活性を報道した。用量は100 mg/kgの場合、アンドログラフォライドは50%腫瘍の成長を抑制できる。抗癌性もHT-29人結腸癌ヌードマウスとB16F0骨髄瘤モウスのモデルで検証された。内服量200 mg/kg、一日二回、アンドログラフォライドは骨髄瘤と結腸癌の成長抑制率は39%と52%に達する。

【0081】

50

アンドログラフォライドでMCF-7人乳腺癌モウスマデルを治療し、ウェスタンブロット解析法により、腹腔或いは皮下に接種する腫瘍に100 mg/kgアンドログラフォライドが顕著にp27の発現を増やせると発見した。(Rajagopal et al., J. Exp. Ther. Oncol. 2003, 3, 147-158), 後者は細胞周期G1期の主要CDK抑制剤である。細胞周期依存する蛋白キナーゼで、CDK4はただ腹腔注射接種腫瘍の中に減少し、皮下注射には変化はない。この結果はアンドログラフォライドが細胞周期への抑制は細胞周期関連蛋白の発現により実現させると示す。

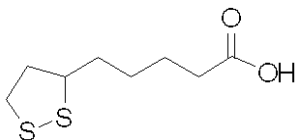
【0082】

アルファリボ酸

Alpha-リボ酸(LA)は各種原核、真核細胞に存在している。人間体内に、多くのエネルギー形成に関わる2-オキソ酸デヒドロゲナーゼの一部分で、一部多酵素複合体の補助因子である。(Biewenga et al., Drug Metab. Rev. 1997, 29, 1025-1054)。アルファリボ酸及びその還元式脱水素リボ酸(DHLA)、酸化還元物質として、脱水素酵素からNAD⁺へ電子を移転する。実際には、脱水素リボ酸はアルファリボ酸より、もっと強い抗酸化性を持っている。酵素以外、体内外の研究で、アルファリボ酸が強大な微量栄養物質に用いられ、多種薬理学、抗酸化特性を持つことを発見する。薬理学には、アルファリボ酸は肝の抗インスリン物質の制御、糖尿病起こす神経病変を改善でき、有効に重金属中毒を軽減できる。抗酸化剤として、直接フリーラジカルを除去でき、過渡金属イオンをキレート化させられる。例えば鉄、銅など。細胞質のグルタチオンとビタミンCの含有水準を上げられ、それらの失いで起こす毒性を阻害できる。これら違っている効能がアルファリボ酸は多種生理学、薬理学メカニズムにより働きを発揮させる。(Smith et al., Curr. Med. Chem. 2004, 11, 1135-1146)。このため、アルファリボ酸は多く使われる保健補充剤の一つである。ドイツで、アルファリボ酸が糖尿病で起こす症状性神経病治療薬物として批准するのがもう20年の歴史を持った。アルファリボ酸の構造は以下のようにである。

【0083】

【化13】



【0084】

アルファリボ酸は強い抗酸化剤 (antioxidant) である。Lester Packer (Free Radic. Biol. Med. 1995, 19, 227-250) は多くの研究材料により、リボ酸が一番強い生物酸化剤と思う。第一、LA/DHLAは直接フリーラジカルを除去できる。水酸基、過酸化水素、次亜塩素酸と純酸素を含む。(Packer et al., Free Radic. Biol. Med. 1995, 19, 227-250; Matsugo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, 227, 216-220)。次に、過渡金属イオンをキレート化させ、相対的弱い酸化剤を(例えば過酸化陰イオン、過酸化水素)有害な水酸基活性物に転化させられる(Matsugo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, 227, 216-220)。最後、他の抗酸化剤を再生できる。酸化還元剤の効能に酸化型抗酸化剤を有効な還元新式に再循環が必要である。DHLAも強い還元剤である。酸化型抗酸化剤を再循環させられる(Matsugo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, 227, 216-220)。DHLAは酸化形式から直接アスコルビン酸塩、間接にビタミンEを再生し、更に、グルタチオンを還元型に還元させられる、(Jocelyn, P. C. Eur. J. Biochem. 1967, 2, 327-331)。実際に、体内外の実験で、アルファリボ酸は細胞内グルタチオンの含有量を増やせることが発見された。(Busse et al., Arzn. Forsch. 1992, 42, 829-831)。動物に抗酸化剤アルファリボ酸を注射し、グルタチオンが30%-70%増加した。特に、肺と腎臓の細胞のなかで顕著である。

【0085】

Zhang et al. (FASEB J. 2001, 15, 2423-2432) は人大動脈内皮細胞 (HAEC)をモデルにし、LA及びグルタチオン、ビタミンCがTNF- α 誘導粘着分子発現とNF-kappa B信号で

の伝導作用について研究する。アルファリボ酸 (0.05-1 mmol) でHAECを前処理し、48時間で用量依存的にTNF- α (10 U/ml) 誘導するNF-kappa Bの結合活性(Fig. 10)を抑制できる。アルファリボ酸濃度が0.5 mmol/lになる場合、TNF- α 誘導したNF-kappa B活性が81%に抑制させる。このTNF- α 誘導する内皮細胞活性化への抑制作用は金属キレート作用を示し、一般の抗酸化剤反応ではない。これもHAECを前処理し、48時間後、最大の抑制効能を発揮させられるのが、細胞内金属キレート作用を除去することが緩慢なプロセスからである。

【0086】

De Mark et al. (J. Cell Physiol. 2003, 194, 325-340) は、アルファリボ酸が体内でヒストンを過度アセチル化を誘導し、正常細胞と変化した細胞の成長、生存能力に違っている効果がある。モウス間の間質細胞系が人類腫瘍細胞FaDu とJurkat、及びKi-v-RasはBalb/c-3T3に改造させ、アルファリボ酸で処理すると、全部衰亡した。相応的に、アルファリボ酸で処理したのが細胞系が改造されなく、細胞周期がリバーシブルにG₀/G₁ 期に停滞されだけである。アルファリボ酸は細胞周期依存性蛋白期キナーゼ抑制剤水準を翻訳される後高くさせる。動物に対する実験で、アルファリボ酸はシクロホスファミドとビンクリスチンで起こす副作用を軽減したが、薬の効果に影響はないと示す (Berger et al., Arzneimittelforschung 1983, 33, 1286-1288)。最近、Dovinova, et al. (Neoplasma, 1999, 46, 237-241) はアルファリボ酸(16 mg/kg) とアドリアシン (5 mg/kg) を連合使用すると、L 1210白血病.モウス生存率の67%を向上させる。アルファリボ酸は腹腔を経路し投与するLD₅₀が160 mg/kgまであって、前記の結果が珍しいと証明する。

【0087】

アルファリボ酸が体外で存在するが、動物実験モデルと人体内に抗腫瘍活性が持つことはもう実証された、ただ、効能メカニズムがまだ明確ではない。前記記載のように、アルファリボ酸はフリーラジカルを除去、NF- κ Bの活性化を抑制、p27の発現を増やせる。しかし、単一のメカニズムでその抗腫瘍活性を釈明することができない、各種のメカニズム毎その作用を自由に発揮できるかも知れない。

【0088】

薬理学に、アルファリボ酸が肝抗シンスリン物質、糖尿病で起こす多種の神経性病変を改善、有効的に重金属中毒を軽減できる。抗酸化剤として、アルファリボ酸は直接活性酸素、フリーラジカルを除去、金属イオンをキレート化させ、例えば鉄、銅。細胞質のグルタチオンとビタミンCを増やし、失うより起こす毒性を阻害する。これら各種の効能が生理学、薬理学のメカニズムを通し発揮する。(Smith et al., Curr. Med. Chem. 2004, 11, 1135-1146)。

【0089】

アルファリボ酸は糖尿病合併症の治療に用いる。近年の研究で、過多のミトコンドリア電子伝達呼吸鎖過酸化物の産生は高糖媒体損害経路を活性化させる要因と発見した。酸化ストレスは糖尿病慢性合併症発生、発展の共通要素である。(Brown, L. Nature 2001, 414, 813-820), 酸化ストレス改善は糖尿病慢性合併症予防、治療の有効方法になり得る。Y orek (Yorek, M. A. Exp. Diabetes Res., 2004, 5, 123-135) たちが、アルファリボ酸が確実に糖尿病血管内皮の効能を改善できると報道した。臨床研究は抗酸化剤が糖尿病患者の自律神経症状(Ziegler D, et al., Diabetologia, 1995, 38, 1425-1433)を改善でき、短期に α -アルファリボ酸を内服すると、II型糖尿病患者インスリン感受性を増強し、更に血糖を下げ、血管合併症を減少させると報道した。(Kamenova P. Hormones (Athens), 2006, 5, 251-258)。

【0090】

前記述べたように、天然アンドログラフォライドの使用歴史が長く、優良な安全性にも備える。特に、研究で独特のメカニズムによりにより、抗腫瘍、免疫調節、抵炎症、保肝、保胆、血糖降下を等多種の効能を持っている。

【0091】

3、治療方法と剤型

10

20

30

40

50

内服に使用する合成物が、本分野薬学化合物生産に既知する如何なる方法で製造できる。薬学に口に合う製剤を提供するために、一種又はそれ以上の甘い化合物、調味化合物、着色化合物と防腐化合物を含める。錠剤は無毒、薬学に受けられ、錠剤生産に適する賦形剤の活性化合物を含む。この賦形剤は不活性希釈剤（例えば炭酸カルシウム、アルギノ酸）、又は粘着化合物（例えば澱粉、ゼラチン、アラビアゴム）と潤滑化合物（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ハード脂肪酸、滑石粉）である。錠剤はコーティングしなくても良い或いは、既知する技術でコーティングして、消化管で錠剤の分解と吸収を延長し、長期に薬効を維持する。例えば、グリセリンステアリン酸エステルを使用して、薬効を延長させる。

【0092】

内服剤型は硬カプセルもある。中の活性成分と不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、燐酸カルシウム、カオリンを混合する。或いは、軟カプセルにする。活性成分と水又は油媒質、例えば落花生油、液体石蠟、オリーブ油と混合する。

【0093】

水懸濁液は水懸濁液生産に適する賦形剤の活性成分を含有する。その賦形剤は懸濁化合物である、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム（tragacanth gum）、アラビアゴム；分散或いは潤湿化合物は天然の燐脂質、例えば、レシチン、脂肪酸アルゲン酸化物の重合体、例えば、17アルキルアルコール酸化エチレンクジラ。或いは、一部が脂肪酸とヘキシトールから誘導するエチレン酸化物の重合体、例えばポリオキシエチレンソルビトール - オレイン酸；又は、一部が脂肪酸と無水ヘキシトールから誘導するエチレン酸化物の重合体、例えば、ポリエチレン脱水ソルビトール - オレイン酸等。

【0094】

水懸濁液は一種又はそれ以上の防腐剤。例えば、エチレン、n - プロピルパラベン及び一種又は多種の着色化合物、甘み化合物、例えば、蔗糖、サッカリンを含有できる。

【0095】

油懸濁液は活性成分懸濁植物油又は鉱物油で製造できる。植物油は落花生油、オリーブ油、ゴマ油、椰子油；鉱物油は液体石蠟等が挙げられる。油懸濁液は増粘化合物、例えば蜜蝋、石蠟、アセチルアルコール；甘み化合物は前記と一緒に、調味化合物は内服に適する製剤を提供できる。これらの合成物が抗酸化剤例えば、アスコルビン酸の使用により、保存する。

【0096】

加水より水懸濁液を製造するに適する可分散粉剤と粉剤は分散、湿潤化合物、懸濁化合物及び一種又は多種防腐剤の活性成分を提供する。適当な分散、湿潤化合物、懸濁化合物は前記化合物に適用する。付加の賦形剤、例えば甘み、調味と着色化合物も含有できる。

【0097】

本発明の薬用合成物は水中油型乳液でもある。植物油、例えばオリーブ油、落花生油；鉱物油は例えば液体石蠟及びその混合物。適当な乳化化合物は天然の樹脂例えばアラビアゴム、トラガカントゴム、天然存在する燐脂質、例えば大豆、レシチン、及び脂肪酸、ヘキシトール誘導するエステル、部分エステル、無水化合物、例えば、脱水ソルビトール及び前記の部分エステルとエチレン酸化物の重合体。例えば甘み、調味、着色化合物等が用いられる。

【0098】

シロップ剤（Syrups）は甘み化合物例えばグリセリン、酸グリセロールソルビトール或いは蔗糖と混和し製す。この剤型は緩和剤、防腐剤、調味、着色剤と混和できる。薬学的の混和物が無菌注射できる水、或いは水、油の懸濁液である。この懸濁液は本分野で既知使用する適当に分散又は湿潤化合物、及び前記の懸濁化合物である。無菌注射剤は無毒、生理的に受けられる希釈剤又は無菌注射溶液、懸濁液。例えば、3-ブタンジオール溶液。これら使用できる賦形剤の中に、リンゲル液と等張性塩化物溶液と混和できる。また、無菌混合油は一般的には溶剤と懸濁媒介に使う。このため、あらゆる合成単体、グリセロー

10

20

30

40

50

ルエステル(2)の温和混合油が使え、脂肪酸例えばオレイン酸が注射製剤に使える。

【0099】

活性化化合物は直腸投薬の座薬で投与できる。これらの化合物は薬物混合と適当非刺激賦形剤を混和成型する。常温には固体で、直腸温度で液体になり、直腸で溶け、薬物を放つ。この物質はカカオバター、ポリエチレングリコールである。

【0100】

活性化化合物は直腸投薬の座薬で薬品と結合できる。これらの化合物は薬物混合と適当非刺激賦形剤を混和成型する。常温には固体で、直腸温度で液体になり、直腸で溶け、薬物を放つ。この物質はカカオバター、ポリエチレングリコールがある。

【0101】

活性化化合物は無菌媒介の非腸に使用できる。賦形剤に依存、使用する濃度薬品は懸濁剤又は賦形剤に溶ける。有益例えば局部麻酔剤助剤、防腐剤、緩和化合物は賦形剤に溶解できる。

【0102】

本発明の混和物が連続又は不連続にあらゆる特定分子相容の経路で投薬できる。このように、適当に、投薬は経口、又は非経腸で、皮下、静脈、吸入、鼻腔、腹腔内経路である。また、不連続投薬が毎日一回、二日間一回、三日間一回、週に一回、週に二回、二週一回、月に二回、月に一回定期的に大型薬剤を注射するできる。

【0103】

本発明の治療化合物はあらゆる方法で、直接(例えば、注射により、移植する局部又は組織部位の局部に投薬)又は全身的に(腸と口経路ではなく)個体に提供する。この中、合成物是非経腸経路式投薬、例えば静脈、皮下、目、腹腔、筋肉、口腔、直腸、腔、真皮下、皮膚、気管、大脳、頭蓋内、脊柱内、心室内、髄腔内、脳槽内、嚢内、鼻内又はエアロゾルで投薬する。優選な混和物は部分水、生理に相容の液体懸濁又は溶液の部分。これによって、担体又は賦形剤は生理的に受けられ、患者需用混和物を輸送以外、患者の電解質とポリウムバランスに影響はない。これにより、試薬の液体媒介は所定のリンゲル液又はPH3~7.4のバッファ液である。言い換えると、本発明の治療混和物が連続的、又は拍動的のマイクロポンプ投薬作用は本発明に使用できる。

【0104】

非腸管投薬の有益溶液は製薬分野既知あらゆる方法で製造できる。前記述べた、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., 1990。発明中の治療試薬剤形は、例えば、ポリアルキレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、水素化ナフタレン等が挙げられる。特に、直接投薬の剤形はグリセリンと他の高粘度合成物を含み、試薬を需用部位に維持させる。生物相容の優選生物可吸収な重合体は、ヒアルロン、コラーゲン、三リン酸カルシウム、ポリ-酪酸、環状エステル/グリコリド重合物及び環状エステル/グリコリド共重合物等があり、体内試薬の放出に有益な賦形剤である。他の潜在するこれら試薬の非腸管運送システムは、エチレン、エチレンワックスエステル重合物顆粒、浸透ポンプ、可移植浸剤とリボソーム。吸入投薬の剤形は賦形剤を含有する剤形、例えば、乳糖；又は含水溶液、例えばポリオキシエチレン9 - ポリオキシエチレンラウリルエーテル、グリココール酸エステル、デオキシコール酸エステル；或いは点鼻式の油溶液、鼻内に応用するゲル。非腸管投薬の剤形は口腔経路のグリココール酸塩、直腸経路投薬するメトキシサリチル酸塩、腔経路のcutric酸などがある。直腸経路投薬する座薬は、本発明(単独又は基剤と結合する)の治療化合物と非刺激賦形剤の混和より製する。賦形剤はカカオ脂又は他の室温で固体、体温で液体になる化合物である。

【0105】

溶解、懸濁、水又は非溶剤に乳化により製し合成する本発明新しい化合物が、注射で投薬できる。メチルスルホキシド(Methylsulfoxide)、N,Nジメチルアセトアミド(N,N-dimethylacetamide)、N,N -ジメチルホルムアミド、植物油或いは類似的油、合成脂肪酸、グリセリド、高脂肪酸エステル、プロピレングリコール等が非水溶剤として挙げられる。この化合物は優選水溶液と製する、例えば、Hank液、リンゲル液、生理学的生理食塩水緩

10

20

30

40

50

衝水溶液 (physiological saline buffer solution)。

【0106】

薬学的に許容される本分野既知担体と結合製する本発明アンドログラフォライドは経口で投薬できる。担体は内服錠剤、懸濁液、液体又はゲルに混和、製する出来る。内服の製剤は各種の方式に使える、例えば、固体賦形剤を化合物と混合、研磨する混合物、適当助剤を加える粒状混合物等。下記のリストは内服に用いられる賦形剤の例を挙げる：糖、例えば乳糖、蔗糖、マンノース、ソルビトール；セルロース製剤、例えばトウモロコシ澱粉、こむぎ澱粉、ジャガイモ澱粉、ゼラチン、レンゲガム、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、ヒドロキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン(PVP)。

10

【0107】

本発明は、アンドログラフォライド誘導体はエアゾール剤にして、増圧栓、噴霧器、粉末吸入システムにより噴出できる。噴霧器で使える適当な推進剤はジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンと二酸化炭素がある。増圧噴霧器で、バルブにより、噴出量を調整できる。

【0108】

皮膚表面に局部投薬の剤形は、本発明治療合成物分子の分散と皮膚病学に受けられる担体、例えば洗剤、乳膏、軟膏、石鹸で制する。特に有益なのは、担体が皮膚で膜を形成し、局部に応用でき、移動を抑制する。局部、内組織表面の投薬に対し、試薬は液体組織又は他の既知担体に分散し、吸収効果を強める。例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、或いはフィブリノーゲン/凝血酵素溶液が使い、長所を伸ばさせる。言い換えれば、組織塗り溶液には、例えばペクチン含む剤形は使える。

20

【0109】

本発明の化合物は抗癌薬物、耐薬性腫瘍の治療薬物、抗微生物(細菌とウイルス感染)薬物に使える。本発明のアンドログラフォライド誘導体は糖尿病薬に適用する。これらの化合物が単独投薬、又は他の治療試薬に結合使用できる。

【0110】

本発明の薬学的組成物は有効量のアンドログラフォライド誘導体を含む。化合物の量は患者の体重、病情、投薬式によって決まり、投薬量を決まる時、主治医師の判断も配慮すべく。アンドログラフォライド誘導体投薬量の確認が本分野技術人員能力に限る。

30

【0111】

アンドログラフォライド誘導体の有効量は患者により変わるが、適当、典型的な用量はほぼ1mg/kg-1g/kgである。

【0112】

一部の病例で、固定用量範囲以上の薬物が投与需用である。必要なのが、主治医師が特定患者の反応より、何時、どのように投薬を中止、調節、終止をよく分かることである。

【0113】

下記の実施例より更に本発明を説明する。本発明の範囲限定ではない。本分野技術人員に対し、本発明の目的と意義を離れず、材料と方法の変更を実現できる。本発明の化合物が体内、動物モデル実験に下記記載の試薬測定效能を使用できる。

40

【実施例】

【0114】

下記の実施例に本発明を詳細に説明する。これらの実施例は説明だけで、本発明の範囲限定ではない。

【0115】

実施例1. 3,19-イソプロピリデン-アンドログラフォライド1を制する

アンドログラフォライド(150 mg, 0.43 mmol)を2,2-ジメトキシプロパン(0.2 mL)、スルホン酸ピリジンハム (3 mg)、トルエンDMSO (3 mL/0.4 mL) の混合溶液に溶解し、80 °Cで1時間攪拌した。反応が終わる後、室温に冷却し、トリエチルアミン(0.1 mL)で反応を終わらせる。トルエン(20 mL)で希釈し、水(3×5 mL)で洗う。Na₂SO₄で有機層を乾燥し

50

、濃縮する。産生する白色固体をエーテルで洗い、濾過し化合物を得る。1 (130 mg, 78%) (Srinivas et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 4711-4717)。

【0116】

実施例2. 14-アシルリボ-3,19-イソプロピリデン-アンドログラフォライド2を制するクロロ酸エチル(0.11 mL)をアルファリボ酸 (214 mg) のCH₂Cl₂(8 mL)溶液に加え、トリエチルアミン0.21 mLを投入、窒素の保護で0 °Cで1 時間攪拌した。化合物1 (100 mg) をCH₂Cl₂ (8 mL)に溶解させ、この混合物に入れ、常温で2日間を攪拌する。反応後CH₂Cl₂ (30 mL)を加え希釈し、順番に NaHCO₃溶液と水で洗う。無水NaSO₄で有機層を乾燥し、真空濃縮する。混合物がシリカゲルカラムで分離し、黄色い結晶性粉末化合物2 (90 mg, 61%)を取得する。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ 7.03 (t, 1H, J = 5.20 Hz), 5.90 (d, 1H, J = 6.50Hz), 4.90 (s, 1H), 4.20 (dd, 1H, J = 7.20, 17.20 Hz), 3.90 (d, 1H, J = 11.99 Hz), 1.42 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 0.81 (s, 3H)。MS (ESI) [M+H]⁺ m/z 578。

10

【0117】

実施例3. 14-アシルリボ-3,19-ジヒドロキシ-アンドログラフォライド-AL-1を制する

化合物2 (100 mg) を酸性水溶液(AcOH/H₂O = 7/3, 3 mL) に加え、, 常温で1時間を攪拌する。反応混合物に水とNaHCO₃を加え、CH₂Cl₂ (3 × 20mL)により抽出する。有機層は無水NaSO₄で乾燥、真空濃縮する。混合物はシリカゲルカラムで分離し、黄色い結晶粉末化合物AL-1 (42 mg, 45%)を取る。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): 7.03 (t, 1H, J = 5.20 Hz), 5.93 (d, 1H, J = 6.50Hz), 4.88 (s, H), 4.50 (s, 1H), 4.24-4.17 (dd, 1H, J = 6.80, 18.40 Hz), 3.34-3.32 (d, 1H, J = 10.79 Hz), 1.34 (s, 6H)。HRMS [M]⁺m/z 538.2417, (calcd 538.2408)。

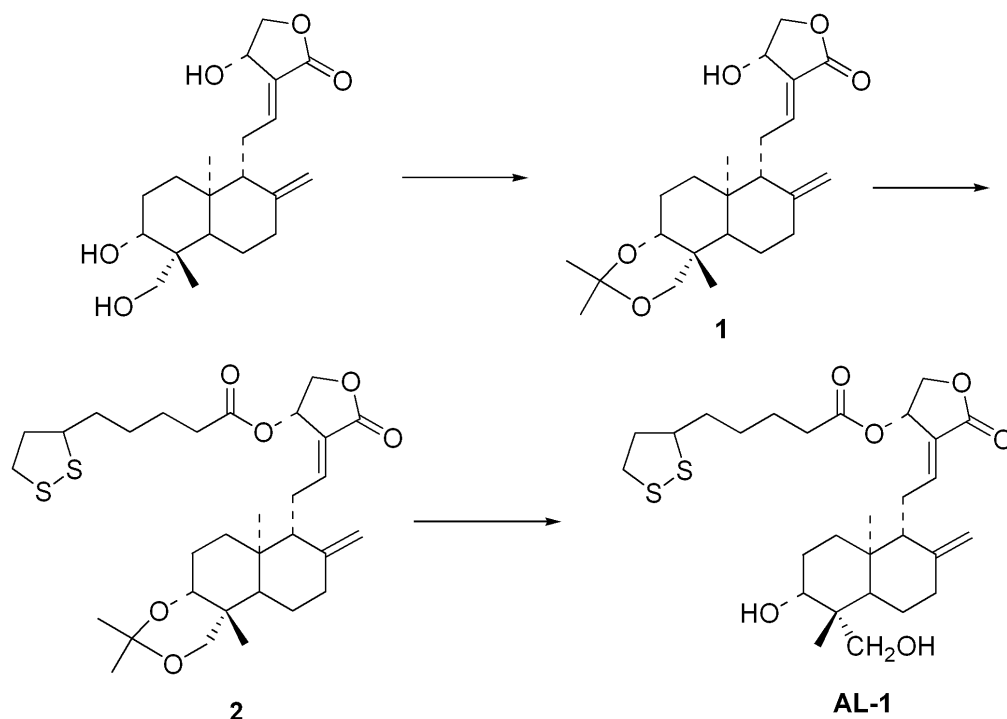
20

【0118】

合成反応式は以下である：

【0119】

【化14】



30

40

50

【0120】

実施例4. 14-[4'-フルオロシンナミル]-3,19-イソプロピリデンアンドログラフォライド3を制する。

【0121】

クロロギ酸エチル(56 μ L)を4'-フルオロシンナミル(85 mg)の CH_2Cl_2 (4 mL)溶液に加え、トリエチルアミン(107 μ L)を入れ、窒素の保護で0℃で1時間攪拌する。化合物1 (100 mg)を CH_2Cl_2 (4 mL)に溶解させ、この混合物に入れ、常温で2日間攪拌する。反応後 CH_2Cl_2 (40 mL)をいれ、希釈する、順番に NaHCO_3 溶液と水で洗う。無水 NaSO_4 で有機層を乾燥し、真空濃縮する。シリカゲルカラムで混合物を分離し、化合物3 (85 mg)を得る。

10

【0122】

実施例5. 14-[4'-フルオロシンナミル]-3,19-ジヒドロキシアンドログラフォライドAFを制する。

【0123】

化合物3 (70 mg)を酸性水溶液 ($\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O} = 7/3$, 2 mL)に加え、常温で1時間攪拌する。反応した混合物 NaHCO_3 水溶液に入れ、 CH_2Cl_2 (3 $\times$ 20mL)で抽出する。無水 NaSO_4 で有機層を乾燥し真空濃縮する。シリカゲルカラムで混合物を分離し、化合物AF (45 mg)を得る。

【0124】

実施例6. 14-[4'-クロロシンナミル]-3,19-イソプロピリデンアンドログラフォライド4を制する。

20

【0125】

クロロギ酸エチル(56 μ L)を4'-クロロシンナミル(95 mg)の CH_2Cl_2 (4 mL)溶液の中に入れる。トリエチルアミン(107 μ L)を加え、窒素の保護で0℃で1時間攪拌する。化合物1 (100 mg)を CH_2Cl_2 (4 mL)に溶解させ、この混合物に入れ、常温で2日間攪拌する。反応後 CH_2Cl_2 (40 mL)をいれ、希釈する、順番に NaHCO_3 溶液と水で洗う。無水 NaSO_4 で有機層を乾燥し、真空濃縮する。シリカゲルカラムで混合物を分離し、化合物4 (68 mg)を得る。

【0126】

実施例7. 14-[4'-クロロシンナミル]-3,19-ジヒドロキシアンドログラフォライドACIを制する

30

化合物4 (45mg)を酸性水溶液 ($\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O} = 7/3$, 2 mL)に加え、常温で1時間攪拌する。反応した混合物 NaHCO_3 水溶液に入れ、 CH_2Cl_2 (3 $\times$ 20mL)で抽出する。無水 NaSO_4 で有機層を乾燥し真空濃縮する。シリカゲルカラムで混合物を分離し、化合物ACI (40 mg)を得る。

【0127】

実施例8. 14-[4'-ニトロシンナミル] 3,19-イソプロピリデンアンドログラフォライド5を制する。

【0128】

クロロギ酸エチル(56 μ L)を[4'-ニトロシンナミル] (100 mg)の CH_2Cl_2 (4 mL)溶液に加え、トリエチルアミン(107 μ L)を入れ、窒素の保護で0℃で1時間攪拌する。化合物1 (100 mg)を CH_2Cl_2 (4 mL)に溶解させ、この混合物に入れ、常温で2日間攪拌する。反応後 CH_2Cl_2 (40 mL)をいれ、希釈する、順番に NaHCO_3 水溶液と水で洗う。無水 NaSO_4 で有機層を乾燥し、真空濃縮する。シリカゲルカラムで混合物を分離し、化合物5(115 mg)を得る。

40

【0129】

実施例9. 14-[4'-ニトロシンナミル] 3,19-ジヒドロキシアンドログラフォライドANOを制する。

【0130】

化合物5 (95 mg)を酸性水溶液 ($\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O} = 7/3$, 3 mL)に加え、常温で1時間攪拌する

50

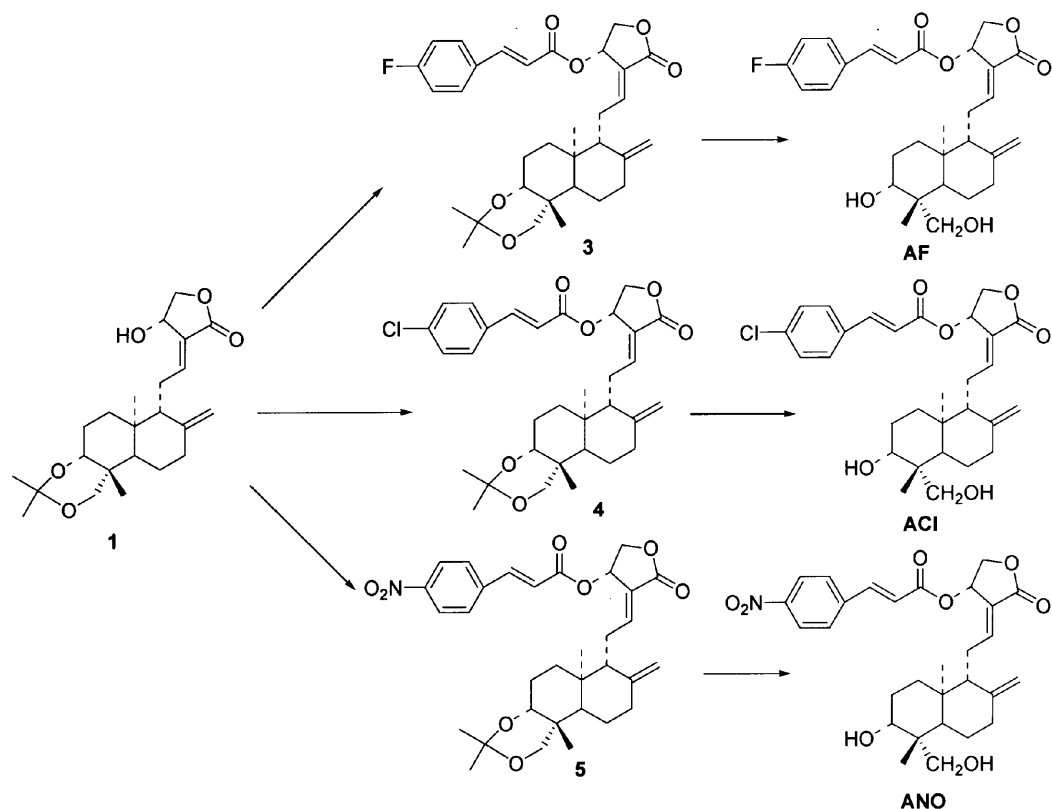
。反応した混合物 NaHCO_3 水溶液に入れ、 CH_2Cl_2 (3 × 20mL)で抽出する。無水 NaSO_4 で有機層を乾燥し真空濃縮する。シリカゲルカラムで混合物を分離し、化合物ANO (60 mg)を得る。

【0131】

化合物 AF、ACI とANO 合成反応式は以下である：

【0132】

【化15】



10

20

30

【0133】

実施例10. 体外L1210白血病細胞に対する抗腫瘍活性

L1210細胞 ($1.5\text{--}2.0 \times 10^5$ cells/mL)をそれぞれ96ウェル培養板(90 μL /ウェル)に接種し、系列累加濃度のアンドログラフォライド誘導体と陽性対照薬品塩酸アドリアマイシン(Dox, 10 μL /ウェル)。37 $^\circ\text{C}$ で、5% CO_2 、飽和湿度の培養ケースで48時間培養する。5 mg/mLのMTT (20 μL /ウェル)を加え、同じ条件で4時間培養する、DMSO (150 μL /ウェル)を加え、青紫色結晶を溶解し、ELISAリーダーで (570/630 nm) 吸光度 (A値)を測定する。

【0134】

表1は体外L1210白血細胞への抗腫瘍活性。表1のデータが新しいアンドログラフォライド誘導体はアンドログラフォライド及び臨床によく使われる穿琥寧、炎琥寧、及び蓮必治より、もっと強く抗腫瘍活性を持っている。

40

【0135】

【表 1】

化合物	IC ₅₀ (μM)
Andro	28.74±6.19
AL-1	8.04±1.92
ANO	9.96±2.25
穿琥寧	>100
炎琥寧	>100
蓮必治	>100

10

【0136】

実施例11. 細胞周期と細胞のアポトーシス測定

L1210細胞 (1.5-2.0×10⁵ cells/mL)をそれぞれ6ウェル培養板 (4 mL/ウェル), 一定濃度の待測定アンドログラフォライド誘導体と陽性対照薬品塩酸アドリアマイシン (1.72 μM)を入れ、37 °C、5% CO₂、飽和湿度の培養ケースで48時間培養する。遠心して培養基を除去し、PBSで二回洗って、-20°Cで固定一晩おいてから、遠心する。PBSで洗ってエチルアルコールを除去する。RNase A (200 μg/mL, Sigma) 37 °Cで1時間培養する、PI (50 μg/mL, Sigma) 避光、30 min染色する。フローサイトメトリーで測定する。

20

【0137】

濃度は10 μMの場合、アンドログラフォライド誘導体AL-1 とANOはL1210細胞を12 時間後、G₁前期に停滞させられ、即ち衰亡を起こす。アンドログラフォライドはL1210細胞をG₀-G₁期に停滞させられる。陽性対象薬物DoxはL1210細胞をG₂期に停滞させ、臨床使用するアンドログラフォライド誘導体穿琥寧、蓮必治がL1210細胞周期を変わらせない。(下記図表1-8ご参照ください)。アンドログラフォライド誘導体AL-1の細胞毒性はアンドログラフォライドの3倍に強く、L1210細胞のアポトーシスも起こせる。

【0138】

実施例12. 細菌阻止帯実験

穴あけ法で (Chitnis et al., Mol. Microbiology 1993, 8, 583-589)、Andro、AL-1、ANO、穿琥寧、炎琥寧及び蓮必治をそれぞれ黄色ブドウ球菌及びその耐薬菌株(MRAS5676和5677)、大腸菌、枯草菌、緑膿菌を含有するLB固体培養基の培養皿に置き (カンジダアルビカンスはYP固体培養基を使う)、37 °Cで24時間培養して、細菌阻止帯の大きさを測定する。表2は体外抗微生物活性、表2示すように、天然アンドログラフォライド及び3種臨床に常用のアンドログラフォライド誘導体炎琥寧、穿琥寧と蓮必治は全部抗菌活性を持っていないが、新しい合成するアンドログラフォライド誘導体AL-1とANOは野生型黄色ブドウ球菌と抵抗する上、メチシリン耐薬菌株MRSA5676と5677にも抑菌活性がある。

30

【0139】

40

【表 2】

化合物	細菌阻止直径 (mm)						
	大腸菌	緑膿菌	枯草杆菌	黄色ブドウ球菌			カンジダアルビカンス
				野生型	MRSA5676	MRSA5677	
Andro ^a	b	b	b	b	b	b	b
AL-1 ^a	b	b	b	4.9±0.81	6.9±0.80	4.1±0.77	b
ANO ^a	b	b	b	8.3±0.99	8.1±0.64	6.4±0.42	b
穿琥寧 ^a	b	b	b	b	b	b	b
炎琥寧 ^a	b	b	b	b	b	b	b
蓮必治 ^a	b	b	b	b	b	b	b
陽性	ゲンタマイシン	ゲンタマイシン	ストレプトマイシン	ストレプトマイシン	バンコマイシン	バンコマイシン	ナイスタチン
対照	20.1±1.00	21.0±1.00	22.1±1.00	21.2±1.00	20.0±1.00	21.0±1.00	10.00±1.00

10

【0140】

この中、陽性対照薬物：ストレプトマイシン 0.15 mg/ウェン，ゲンタマイシン 0.10 mg/ウェン，バンコマイシン 0.15 mg/ウェン，ナイスタチン 0.10 mg/ウェン；^a三回繰り返す実験の標準差、化合物 0.05 mg/ウェン；^b 無活性(細菌阻止直径は4 mmより小さいです)。

20

【0141】

実施例13. 最低抑菌濃度(MIC)実験

二倍希釈法で、Andro、AL-1とANO、穿琥寧、炎琥寧及び蓮必治を黄色ブドウ球菌及びその耐薬菌株(MRAS5676和5677)のLB液体培養基を含有する96ウェル培養板に置き、37 °C, 24 時間培養し、595 nm吸光度を測定する。

【0142】

表3は黄色ブドウ球菌及びその耐薬菌株に対し、化合物のMICである。表3が示したように、新しい合成したアンドログラフォライド誘導体AL-1とANOは優良な抑菌活性に備える。同じに、Andro、穿琥寧、炎琥寧、蓮必治のMICが >1 mM。

30

【0143】

【表 3】

菌株	Andro	AL-1	ANO	穿琥寧	炎琥寧	蓮必治	バンコマイシン
野生型	c	1000	62.5	c	c	c	1.56
MRSA5676	c	1000	62.5	c	c	c	1.56
MRSA5677	c	1000	25	c	c	c	3.13

40

この中、Cが無活性(>1 mM)と示す。

【0144】

実施例14. 緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) 成長曲線測定

緑膿菌をLB培養基に接種し、37°C定温、一晚振り培養する。対照グループはLB培養基で、用薬グループはAndro、AL-1とANO、穿琥寧、炎琥寧及び蓮必治を含有するLB培養基である。12時間培養したPA菌液を対照グループと用薬グループの培養基に入れて、待測定菌液の最初A₆₀₀を0.05にさせ、37 °Cで同時に培養する。違ってる時間に菌液波長の測定値が600 nm以下のAを取る。

【0145】

50

下記図2で示っているように、薬物濃度が1 mMである場合、AL-1は顕著に細菌の成長を抑制できる。Androは弱い抑菌活性を持っている。臨床によく使う穿琥寧、炎琥寧、蓮必治は緑膿菌成長に直接抑制作用は無い。

【0146】

実施例15. 緑膿菌素(Pyocyanin)の測定

緑膿菌をLB培養液に接種し、37 °C定温、一晚振り培養する。対照グループはLB培養基で、用薬グループはAndro、AL-1とANO、穿琥寧、炎琥寧及び蓮必治を含有するLB培養基である。12時間培養した緑膿菌菌液を対照グループと用薬グループの培養基に入れて、待測定菌液の最初 A_{600} を0.05にさせ、3-4時間に培養して、 A_{600} は0.3-0.5になる。緑膿菌菌液を対照グループと用薬グループ培養基に投入して、待測定菌液の最初 A_{600} を0.05にさせ、37°Cで同時に18時間培養して、遠心、上澄水と取り、順番にクロロフォルムと0.2 N HCl (薄紅色)を入れて抽出。 A_{520} 測定 (Zielinshi et al., Biol. Chem. 1991, 266, 9754-9763; May et al., Clin. Microbiology Rev. 1991, 4, 191-206)。

10

【0147】

私たちが緑膿菌素の分泌を測定して、待測定化合物が全部緑膿菌素の分泌を抑制できると発見した(下記図3)。緑膿菌素抑制活性は：AL-1>Andro>ANO, AL-1の活性が一番強い。だが、実験でAL-1とANOの濃度はただ穿琥寧、炎琥寧と蓮必治の1/10である。

【0148】

実施例16. 胞外蛋白分解酵素(Protease)の測定

緑膿菌をLB液に接種し、37°C定温、一晚振り培養する。対照グループはPTSB培養基で、用薬グループはAndro、AL-1とANO、穿琥寧、炎琥寧及び蓮必治を含有するPTSB培養基である。12時間培養した緑膿菌菌液をを対照グループと用薬グループの培養基に入れて待測定菌液の最初 A_{600} を0.05にさせ、37°Cで同時に6時間培養して、遠心して、上澄水100 μ Lを取り、5mgのアゾカゼイン (azo-casein)を入れて、1 mM, Tris (pH7.2)10 mM, CaCl_2 10mMを加え、37 °Cで同時に6時間振動反応する、EDTA-Na で反応を終わらせる。上澄水 A_{440} を測定する (Zielinshi et al., Biol. Chem. 1991, 266, 9754-9763; May et al., Clin. Microbiology Rev. 1991, 4, 191-206)。

20

【0149】

全部の化合物が胞外蛋白分解酵素の産生を抑制できる(下記図4)。抑制活性は：AL-1>ANO>Andro。注意すべきなのが、実験でAL-1とANOの濃度はただ穿琥寧、炎琥寧と蓮必治の1/10である。

30

【0150】

実施例17. 原子間力顕微鏡 (AFM) 実験

緑膿菌をLB液に接種し、37°C定温一晚振り培養する。菌液を取って、遠心する。無菌生理食塩水で二回洗ってから、生理食塩水で0.5MCB比濁標準の(細菌数は約 $5 \times 10^{8-9}$ CFU/mL)菌懸液を調合し、この菌懸液を生理食塩水で50倍を希釈して、対照グループはMHB培養基、用薬グループはAndroとAL-1を含むMHB培養基である。薬物と15時間接触して、1 mLの培養液を無菌遠心管に入れて、10, 000 $\times$ g、5分間遠心する。上澄液を捨て、取った細菌サンプルをダブル蒸留水で二回洗い、細菌をダブル蒸留水に懸浮させる。少量の緑膿菌懸濁液を吸い取って、カバースリップに垂れらせて、自然に干しさせた後、CP-Research型原子間力顕微鏡(アメリカ合衆国Thermomicroscopes公司)で測定する。(Paster et al., Antimicro. Chemother. 1994, 34, 679-685; Wicken et al., Antimicro. Agents Chemo ther. 2000, 44, 682-687; Nickel et al., Urology 1986, 135, 586-588)。

40

【0151】

下記図5で、用薬グループ緑膿菌の成長は顕著に無用薬グループに劣っている。新合成誘導体AL-1はAndroより有効であると示す。AL-1 (1 mM)より処理した緑膿菌は密集な菌群に形成出来ない。AL-1が直接緑膿菌のQSシステムを破壊できることを証明する。

【0152】

実施例18. 走査型電子顕微鏡(SEM) 実験

緑膿菌をLB液に接種し、37°C定温一晚振り培養する。菌液を取って、遠心する。無菌生

50

理食塩水で二回洗ってから、生理食塩水で0.5MCB比濁標準の(細菌数は約 $5 \times 10^{8-9}$ CFU/mL)菌懸液を調合し、この菌懸液を生理食塩水で50倍を希釈して、バイオフィルム (BF)担体を2mL菌懸液入れた試験管に入れて、37 °C定温培養、第三日、担体表面に早期BFが形成し、第七日、成熟なBFが (Walters et al., J. Antimicro. Chemother. 2003, 47, 317-323)形成する。二日間ごと培養基を換える。Quanta 400査型電子顕微鏡(オランダ・フィリップス)BFの形成状況を観察する。BFが付着した担体を殺菌生理塩水で洗って浮遊菌を取り除く後、2.5%のグルタルアルデヒドで固定、順番にpH7.4のPBSで3回浸してから、50%、70%、80%、90%のアルコールで各一回脱水して、100%のアルコールで二回脱水して、tert-ブタノールで二回脱水、毎回5分間である。5時間冷凍乾燥後、真空で担体表面に金粉を塗りつけ、SEMで観察し、BFの形成を確認する

10

SEMでBFの観察結果で：早期 (図6) 又は成熟 (図7)の BFはAL-1の作用で、担体表面のBFは対照グループより少ないである。AL-1がPAのBFを破壊できると証明した。Androは顕著にBFの形成を抑制できない。臨床使用される穿琥寧が10 mMの濃度でも (他の化合物は1 mM) 緑膿菌BFの形成を破壊できない。Androの緑膿菌BFに対する破壊作用は弱いである。この実験が再度AL-1の緑膿菌BF形成に対する破壊力を示すした。

【0153】

実施例19. 抗生物質と連合投薬実験

臨床に使用するエリスロマイシン (Erythromycin) とシプロフロキサシン (Ciprofloxacin)が緑膿菌感染に比較的有効な薬物である。前期記載したように、天然のAndroとエリスロマイシン及びシプロフロキサシンが協力作用を持っている。このため、私たちは懸浮の緑膿菌に対し、新合成の誘導体AL-1、エリスロマイシン及びシプロフロキサシンに連合抗菌実験を行った。シプロフロキサシンだけ使うの存活率は85%、シプロフロキサシンとAL-1を連合実験に存活率は54.9% (図4, 各種薬物で処理した後緑膿菌の存活率)。エリスロマイシンだけ使用する細菌の存活率は93.9%、エリスロマイシンと新合成誘導体AL-1連合の細菌存活率は僅か40.8%である。シプロフロキサシンとエリスロマイシン連合使用の細菌存活率は35.7%。この濃度でエリスロマイシン、新合成誘導体AL-1の連合使用とシプロフロキサシン、エリスロマイシン連合使用の抗菌効果がほぼ一緒である。重要なのが、新合成誘導体とエリスロマイシン、シプロフロキサシンの共用効果は遥かにAndro、エリスロマイシン、シプロフロキサシン共用効果より顕著である。これが、再び、AL-1が臨床使用されるAndroより、治療効果が良いと示す。

20

30

【0154】

【表 4】

薬物	生存率 (%)
シプロフロキサシン (0.017 µg/mL)	85
エリスロマイシン (3.75 µg/mL)	93.9
Andro (350 µg/mL)	90.1
AL-1 (538 µg/mL)	84
シプロフロキサシン (0.017 µg/mL) + エリスロマイシン (3.75 µg/mL)	35.7
シプロフロキサシン (0.017 µg/mL) + Andro (350 µg/mL)	65.3
シプロフロキサシン (0.017 µg/mL) + AL-1 (538 µg/mL/mL)	54.9
エリスロマイシン (3.75 µg/mL) + Andro (350 µg/mL)	63.5
エリスロマイシン (3.75 µg/mL) + AL-1 (538 µg/mL/mL)	40.8

10

20

【0155】

Andro (350 µg/mL) と AL-1 (538 µg/mL) 的モル濃度は同じ 1 µmol/mL である。投薬後の緑膿菌は、15時間培養し、OD₆₀₀ 測定A値である。

【0156】

実施例20. STZ誘導糖尿病ラットへの治療効能

雌SDラット30匹、体重180-220 g、16時間絶食後、腹腔注射STZ (sigmaから仕入れ) 60 mg/kg。72時間後尾を切り採血する。この前は16時間絶食させ、血糖測定器(ジョンソン・エンド・ジョンソンカンパニー)血糖を測定する。糖尿病ラットを4グループに分け：Vehicle対照グループ、アンドロ (100 mg/kg) 治療グループ、AL-1 (160 mg/kg) 治療グループ、グリベンクラミド (0.6 mg/kg) 陽性対照グループ。グループ毎4匹を設置する。また、正常対照グループにラット4匹を設置する。体重を秤り、目のふち採血、血清分離、試薬ケース(浙江東陽生物工程有限公司)の説明書により、トリグリセリド(Triglyceride)と総コレステロール(Cholesterol)含有量を測定する。受験のラットが組み分けにより、Andro、AL-1又はグリベンクラミドで治療、日に一回、連続7日間浣胃する。Vehicle対照グループは毎日同量の溶剤 (20% DMSO in H₂O) を投薬する。16時間絶食した後、体重を量り、採血して、治療後の血糖、トリグリセリド、総コレステロールを測定する。データに対して、一元配置分散分析t-検査法を使用する (One-way ANOVA followed by Student's t-test)。表5はSTZ誘導する糖尿病に対しAL-1の治療効果である。表5の示すように、糖尿病ラットが一週間の治療を受けた後、Andro、AL-1は糖尿病ラットの体重下降に保護作用があり、効果はグリベンクラミドとほぼ一緒である。降血糖作用に対して、Andro より、AL-1の治療効果が顕著に(同じモル濃度)良いで、陽性対照グリベンクラミドとほぼ同様に、血糖値に約66%を下げられる。また、AL-1とAndroは糖尿病ラットのトリグリセリドと総コレステロール向上に対して、一定の働きがあり、効果が大体同じである。

30

40

【0157】

【表 5】

目安	日間	溶剤対照	アンドログラフオリ ド	AL-1	グリベンクラミド
体重 (g)	0	196.33±11.93	198.33±10.69	214.33±9.81	201±3.61
	7	170±3.05	194±5.66 ^a	191.67±7.64 ^b	195±1.41 ^a
血糖 (mmol/L)	0	24.93±4.97	22.15±0.35	19.53±1.90	26.9±1.56
	7	23.6±3.06	18.6±0.28	6.63±2.41 ^{b,c}	9.25±0.64 ^{b,c}
総トリグリセリド (mmol/L)	0	7.36±1.03	8.44±2.45	6.28±0.78	7.84±2.21
	7	6.78±0.96	2.04±0.38 ^{b,c}	4.79±0.45 ^c	1.9±0.8 ^{b,c}
総コレステロール	0	2.87±1.4	3.15±1.67	3.39±0.59	2.57±1.09
(mmol/L)	7	2.15±0.05	1.61±0.26 ^a	1.95±0.63 ^a	1.86±0.29 ^c

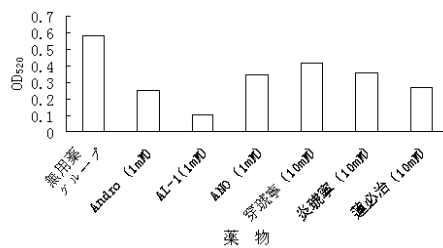
10

【 0 1 5 8 】

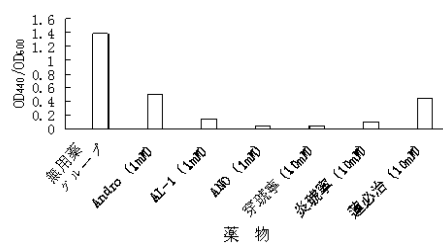
STZ誘導する糖尿病ラットはAL-1で治療し、7日間後、体重、血糖、総トリグリセリドとコレステロール水準の変化。第0天は投薬前、第7日は連続に7日間を投与後と指す。グループ毎に4匹動物を持ち、数値は平均数値±標準差で示す。^aP<0.05, ^bP<0.01は溶剤と対照比較、^cP<0.05は第0天と比較する。(一元配置分散分析t-検査法を採用)

20

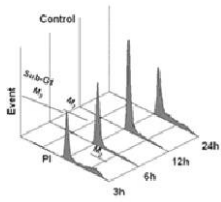
【図 3】



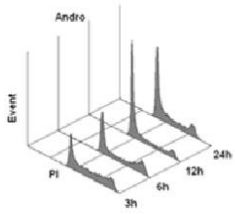
【図 4】



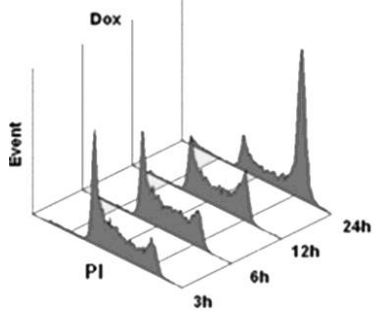
【図 1 - 1】



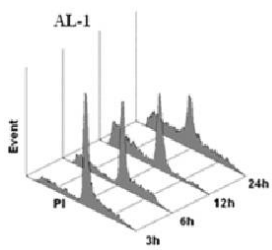
【図 1 - 2】



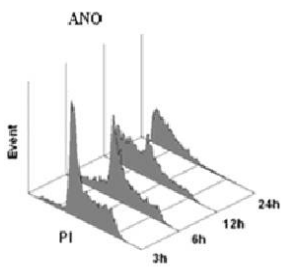
【図 1 - 3】



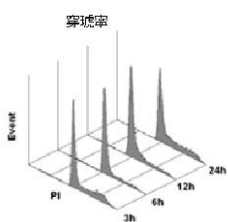
【図 1 - 4】



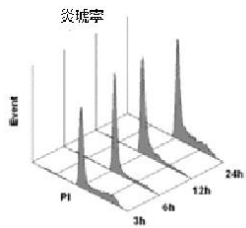
【図 1 - 5】



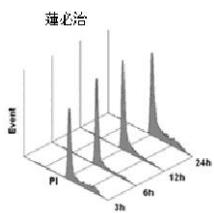
【図 1 - 6】



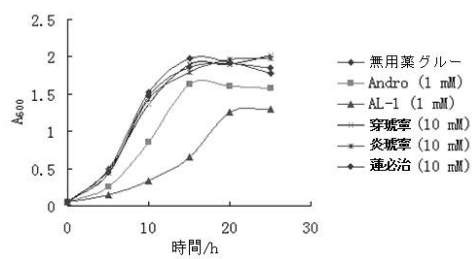
【図 1 - 7】



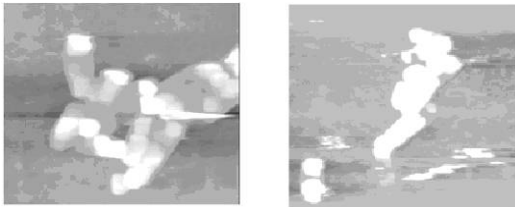
【図 1 - 8】



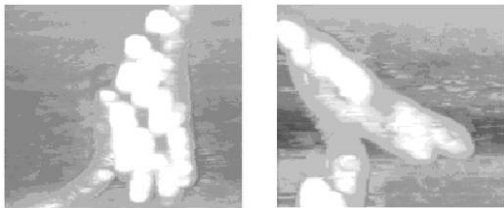
【図 2】



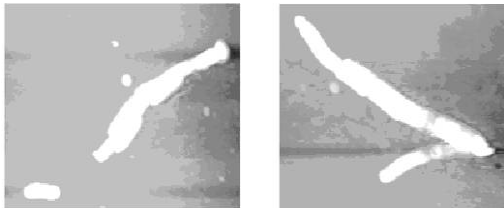
【図 5 - 1】



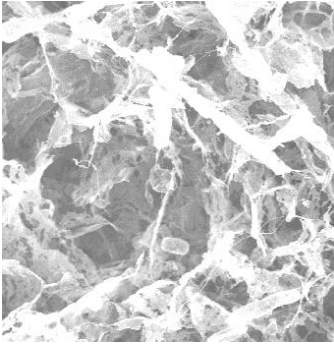
【図 5 - 2】



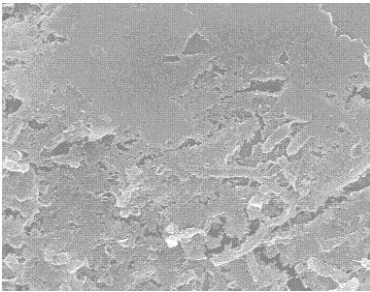
【図 5 - 3】



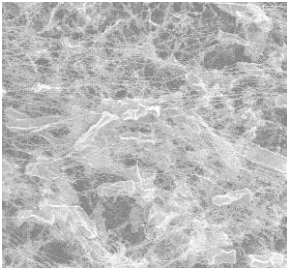
【図 6 - 1】



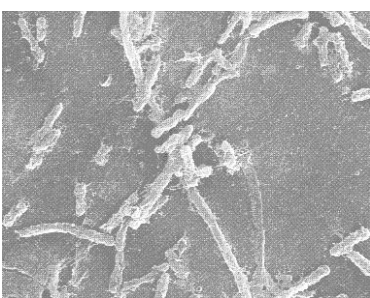
【図 6 - 2】



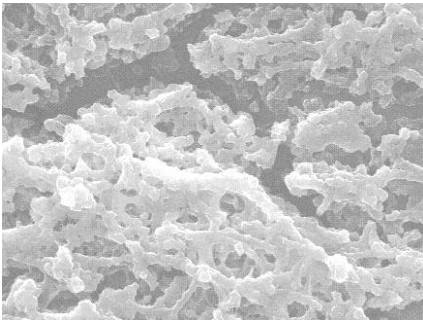
【図 6 - 3】



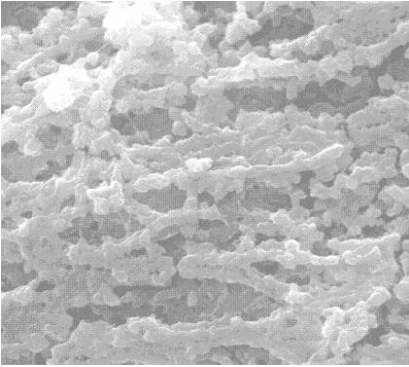
【図 6 - 4】



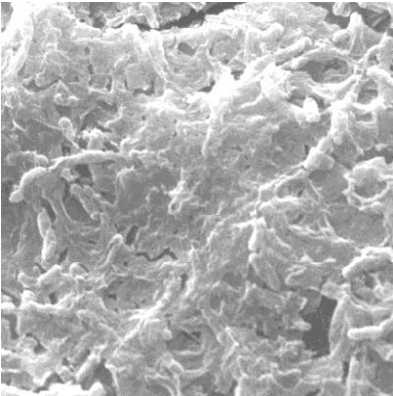
【図 7 - 1】



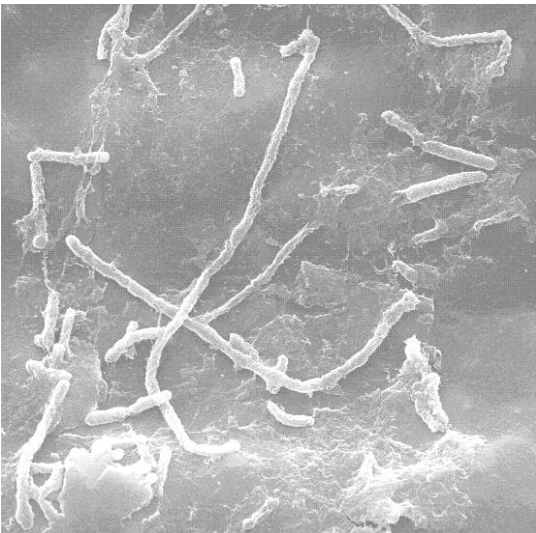
【図 7 - 2】



【図 7 - 3】



【図 7 - 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2008/071919
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC C07D A61K A61P		
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)		
WPI; PAJ; EPODOC; CNKI; CPRS; STN: structural search, andrographolide, andro, chuanxinlian, herb, andrographis, lipoic		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/101538 A2 (CORNELL RES FOUND INC), 28 September 2006 (28.09.2006), see the whole document, especially claim 6 and compound (II-i).	1-10, 16-17
A	WO 01/57026 A1 (DR REDDY'S LAB LTD), 09 August 2001 (09.08.2001), see the whole document, especially claim 1.	1-10, 16-17
A	JP 63088124 A (TOYO JOZO KK), 19 April 1988 (19.04.1988), see the whole document, especially claim 1.	1-10, 16-17
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 October 2008 (28.10.2008)		Date of mailing of the international search report 20 Nov. 2008 (20.11.2008)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer Wangqinghua Telephone No. (86-10)62086306

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/071919

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 11-15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11-15 are directed to a method of treatment of the human/animal body (Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/071919

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1433757 A (SICHUAN YIBIN WULIANGYE GROUP CO LTD), 06 August 2003(06.08.2003), see the whole document.	1-10, 16-17
A	CN 1478774 A (BEIJING MEDICAL PROFESSIONALS BIO-TECHNO), 03 March 2004 (03.03.2004), see the whole document.	1-10, 16-17
PX	CN 101125850 A (JINAN UNIVERSITY), 20 February 2008 (20.02.2008), see the whole document, especially claims and examples.	1-10, 16-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/071919

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2006101538A2	28.09.2006	US2006223785A1	05.10.2006
		EP1817024A2	15.08.2007
		INCHENP200701958E	31.08.2007
WO0157026 A1	09.08.2001	AU3043101A	14.08.2001
		US2002032229A1	14.03.2002
		US6410590B1	25.06.2002
		NO20023643A	30.09.2002
		BRPI0108064A	29.10.2002
		EP1261604A1	04.12.2002
		KR20030004342A	14.01.2003
		CZ20022655A3	16.04.2003
		HU0204347A2	28.05.2003
		JP2003522166T	22.07.2003
		CN1416428A	07.05.2003
		ZA200206112A	28.01.2004
		NZ520521A	28.05.2004
JP63088124 A	19.04.1988	none	
CN1433757A	06.08.2003	CN1293872C	10.01.2007
CN1478774 A	03.03.2004	none	
CN101125850 A	20.02.2008	none	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/071919

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D409/12 (2006.01) i

C07D307/60 (2006.01) i

A61K31/365 (2006.01) i

A61K31/385 (2006.01) i

A61P35/00 (2006.01) i

A61P29/00 (2006.01) i

A61P3/10 (2006.01) i

A61P31/00 (2006.01) i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 D 409/12 (2006.01)	C 0 7 D 409/12 C S P	
A 6 1 K 31/365 (2006.01)	A 6 1 K 31/365	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/496	
C 0 7 D 215/56 (2006.01)	C 0 7 D 215/56	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, T R), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, K G, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ジャン ジエ
中華人民共和国 コワンドン コワンチョウ ファンプロードウェスト 6 0 1
(72)発明者 ザン ザイジュン
中華人民共和国 コワンドン コワンチョウ ファンプロードウェスト 6 0 1
(72)発明者 ヤン ザオキ
中華人民共和国 コワンドン コワンチョウ ファンプロードウェスト 6 0 1
(72)発明者 ユ ペイ
中華人民共和国 コワンドン コワンチョウ ファンプロードウェスト 6 0 1

Fターム(参考) 4C031 PA02

4C037 FA00

4C063 AA01 BB03 CC82 CC97 DD75 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 BB04 BC50 GA02 GA04 GA07 GA12 MA02

MA04 NA14 ZB11 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZC35 ZC75

【要約の続き】

せる上、グラム陰性菌(*Pseudomonas aeruginosa*)のQSシステムを抑制でき、緑膿菌バイオフィルムの形成を抑制し、降糖作用が著しく、抗癌薬、抗炎症薬、糖尿病薬、細菌・ウイルス感染薬の製造に用いられる。

【選択図】なし