

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4465466号
(P4465466)

(45) 発行日 平成22年5月19日(2010.5.19)

(24) 登録日 平成22年3月5日(2010.3.5)

(51) Int.Cl.

F 1

C 0 7 C 59/74 (2006.01)
A 6 1 K 31/185 (2006.01)
A 6 1 K 31/343 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C O 7 C 59/74
A 6 1 K 31/185
A 6 1 K 31/343
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 1 0 5

請求項の数 2 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-244657 (P2004-244657)
(22) 出願日 平成16年8月25日(2004.8.25)
(65) 公開番号 特開2005-306838 (P2005-306838A)
(43) 公開日 平成17年11月4日(2005.11.4)
審査請求日 平成19年3月2日(2007.3.2)
(31) 優先権主張番号 特願2004-87334 (P2004-87334)
(32) 優先日 平成16年3月24日(2004.3.24)
(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 304021831
国立大学法人 千葉大学
千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(72) 発明者 石橋 正己
千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 千
葉大学大学院薬学研究院内
(72) 発明者 鎌田 和明
千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 千
葉大学大学院薬学研究院内

審査官 小川 由美

最終頁に続く

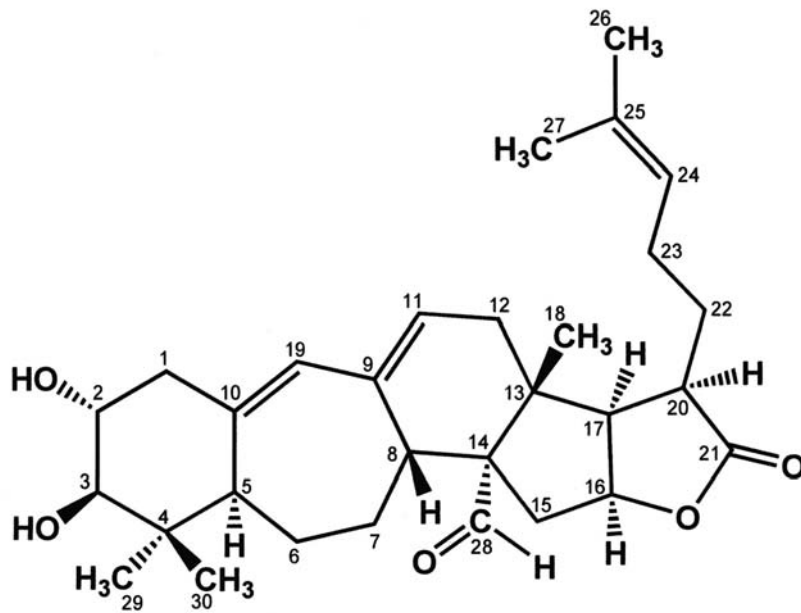
(54) 【発明の名称】 ツピフェラールAおよびツピフェラールB

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(1)式で示されることを特徴とするツピフェラールA。

【化 1】



(1)

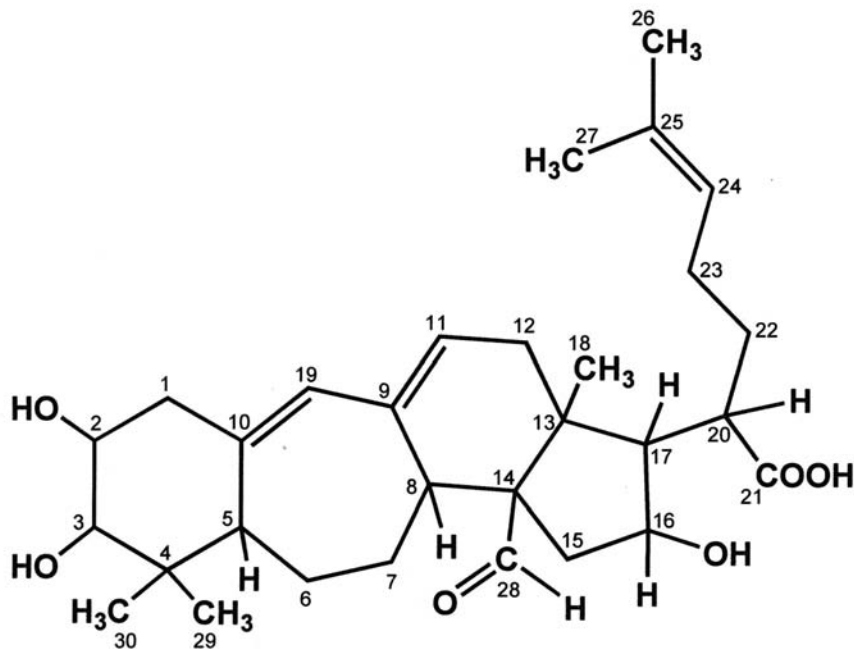
10

20

【請求項 2】

下記(2)式で示されることを特徴とするツピフェラル B。

【化 2】



(2)

30

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規化合物であるツピフェラル A およびツピフェラル B に関する。

【背景技術】

【0002】

21世紀となった現在でも、地球上の人口の6割以上の人々は、ふだんの病気や怪我の治

50

療に、身近な自然の中にある植物や菌類（キノコなど）あるいはそれ由来の生薬を用いていると言われている。また、一方では、現在病院や家庭で使われている医薬品の中には、もともと天然の動植物、微生物などの体の中に含まれる化学成分として見つけ出されたもの（以下、「天然物」と言う）が沢山ある。また、天然の化学成分を原形として化学構造に改良を加えることにより、元の天然物よりも更に有効で安全な合成化合物も数多く開発されている。このように新しい有用な天然物を探すという研究（以下、「ものとり」と言う）は、薬を創り出す出発点とも言うべき大変重要なことと位置づけることができる。

【 0 0 0 3 】

しかしながら、地球上の全ての生物種の中で、これまでに有効成分を探すための材料として研究されたものは未だ 10% にも満たないと言われている。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

本発明は、上述した事情に鑑み、天然の動植物、微生物などに含まれる新規の化学成分を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

本発明者は、人間と地球環境との共存・保全の立場を十分尊重しつつ、未利用資源の開発と有効成分の探索研究に力を注いで、野外採取した変形菌の子実体であるコモチクダホコリ (*Tubifera dimorphotheca*) の成分研究を行い、新規化合物を見出した。なお、今までに野外採取した変形菌の子実体であるコモチクダホコリの成分研究はなされていなかった。

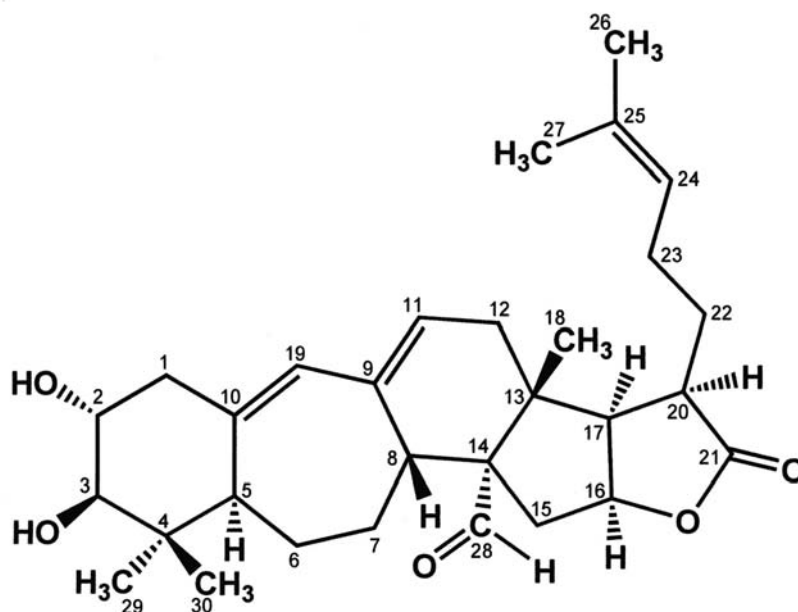
20

【 0 0 0 6 】

かかる本発明の第 1 の態様は、下記 (1) 式で示されることを特徴とするツビフェロール A にある。

【 0 0 0 7 】

【化 1】



(1)

30

40

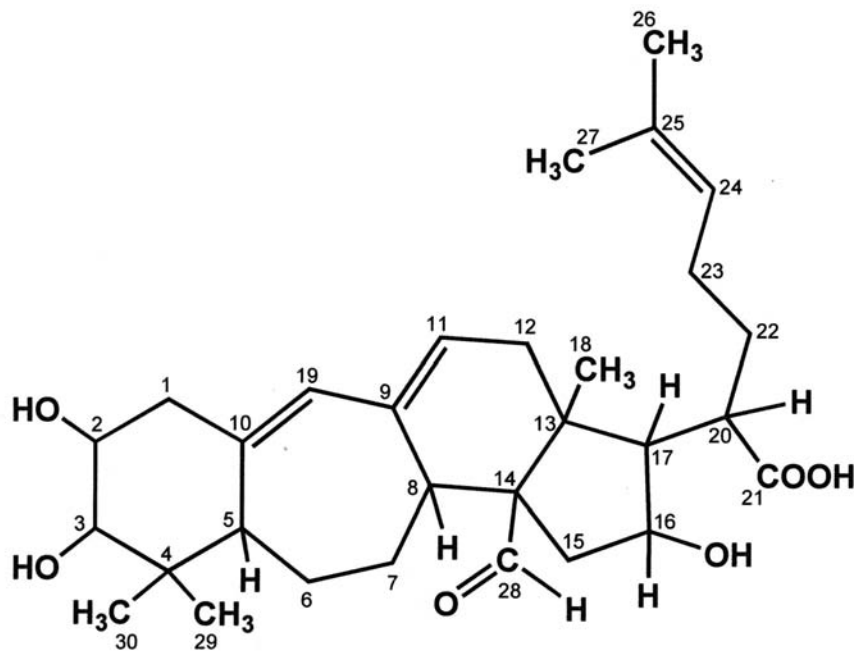
【 0 0 0 8 】

本発明の第 2 の態様は、下記 (2) 式で示されることを特徴とするツビフェロール B にある。

50

【 0 0 0 9 】

【 化 2 】



(2)

10

20

【 発 明 の 効 果 】

【 0 0 1 0 】

本発明は、コモチクダホコリ (Tubifera dimorphotheca) 由来の新規化合物であるツビフェラル A およびツビフェラル B を提供することができる。この新規化合物は有用な生物活性が期待でき、大いに有用な医薬品となる。

【 発 明 を 実 施 す る た め の 最 良 の 形 態 】

【 0 0 1 1 】

以下本発明について詳細に説明する。

30

【 0 0 1 2 】

本発明の新規化合物は、上記(1)式で表されるツビフェラル A (Tubiferal A: 以下「TD-1」とも略称する) および上記(2)式で表されるツビフェラル B (Tubiferal B: 以下「TD-2」とも略称する) である。このツビフェラル A およびツビフェラル B は、コモチクダホコリから単離することにより製造することができる。例えば、野外採取した変形菌の子実体であるコモチクダホコリから90%メタノールおよび90%アセトンを用いて成分を抽出し、分画することにより得ることができ、その方法は限定されない。また、合成してもよい。

【 0 0 1 3 】

本発明のツビフェラル A およびツビフェラル B は、細胞毒性物質として利用できる。テルペノイド系天然物は、ヒト子宮頸がん HeLa 細胞やマウス白血病細胞 P388 等の腫瘍細胞に対する細胞毒性を示すものが多く、特にツビフェラル A の場合分子内にラクトン構造をもつテルペノイドであり、しかも従来前例のない新規化学構造を有するため、新規細胞毒性物質としての有用性が期待される。

40

【 0 0 1 4 】

以下、本発明について実施例に基づき説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【 0 0 1 5 】

(実 施 例)

野外採取したコモチクダホコリ (3.7 g) を、90%メタノール (100 mL) で 2

50

回、続いて90%アセトン(100mL)で1回、ホモジナイザーで粉碎しながら、室温で約10分ずつ抽出し、溶媒を留去して、抽出物305.0mgを得た。この抽出物を20%メタノール(約10mL)に溶解し、下記の条件でカラムクロマトグラフィーにかけ、各成分を分取した。なお、展開溶媒は(a)~(f)の順に流した。

【0016】

<ODS flash c.c.>

分離用担体：ODS(オクタデシルシラン)、直径20mm×長さ200mm

展開溶媒

(a) MeOH/H₂O = 1/4

(b) MeOH/H₂O = 1/1

(c) MeOH/H₂O = 4/1

(d) MeOH/H₂O = 1/0

(e) CHCl₃/MeOH = 1/1及び1/0

(f) CHCl₃/Acetone = 1/1及び0/1

【0017】

各展開溶媒で分取された成分1A~1Fについて、ODS TLC, 90%MeOHを用いて薄層クロマトグラフィー(TLC)を行った。TLC結果から判断して新規化合物が含まれている可能性のあった成分1C((c)の溶離液で分取された成分)20.9mgのうち16.5mgをメタノールに溶解し、さらに下記の条件でHPLCにかけた。

【0018】

<Prep. ODS-HPLC>

カラム：Develosil ODS-HG-5(野村化学社製、直径20mm×長さ2500mm)

移動層：75%MeOH

流速：8.0mL/min

カラム温度：室温

検出波長：254nm

【0019】

これにより、4番目の成分(保持時間Rt32.0分：図1中3Dと記載)としてTD-1(ツビフェラルA)を0.8mg得た。また、分取した1番目の成分(保持時間Rt7.0~11.0分：図1中3Aと記載)9.9mgをメタノールに溶解し、さらに下記条件でHPLCにかけた。

【0020】

<Prep. ODS-HPLC>

カラム：Develosil ODS-HG-5(野村化学社製、直径10mm×長さ250mm)

移動層：65%MeOH

流速：3.5mL/min

カラム温度：室温

検出波長：254nm

【0021】

これにより、2番目の成分(保持時間Rt13.0分：図1中4Bと記載)としてTD-2(ツビフェラルB)を1.2mg得た。図1に分画フロー及び各分取成分の収量を示す。なお図1において、分取した成分を分取した順に左から記載し、1A~1F、3A~3F、4A~4Dという番号を付した。

【0022】

得られたTD-1およびTD-2について、TLCのRf値を測定した。なお測定には、ODS TLC, 90%MeOHを用いた。その結果Rf値は、ツビフェラルAが0.39で、ツビフェラルBが0.64であった。この結果から、ツビフェラルBはツビフェラルAよりも極性が高い化合物であることがわかった。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

また、得られた TD - 1 および TD - 2 について、HRFAB - MS、比旋光度、メタノール中での UV 吸収スペクトル、IR を測定した。各結果を外観とともに表 1 に、TD - 1 のメタノール中での UV 吸収スペクトル (測定溶液の濃度: $1.24 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) を図 2 に、TD - 2 のメタノール中での UV 吸収スペクトル (測定溶液の濃度: $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) を図 3 に示す。

【 0 0 2 4 】

【表 1】

Physico-chemical properties of TD-1 and 2		
	TD-1	TD-2
Appearance :	Colorless amorphous powder	White amorphous powder
Molecular formula :	$\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_5$	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_6$
HRFAB-MS (m/z)	calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_5$: 483.3110 [M+H] ⁺ found : 483.3101	calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_6$: 501.3216 [M+H] ⁺ found : 501.3179 calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_6\text{Na}$: 523.3036 [M+Na] ⁺ found : 523.3081
$[\alpha]_D$ in MeOH	-86.9° (c 0.12)	-45.8° (c 0.20)
UV λ_{max} nm (ϵ)	239 (17600)	240 (20100)
in MeOH	246 (17600)	246 (20200)
IR ν_{max} cm^{-1} (NaCl)	3391, 2927, 2858, 1770, 1715, 1557, 1455, 1386	3418, 2925, 2854, 1709, 1558, 1446, 1362

10

20

【 0 0 2 5 】

次に、ツピフェラル A の構造解析を行った。具体的には、 ^1H NMR, ^{13}C NMR、 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY、HMQC スペクトル、および HMBC スペクトルを測定することにより、図 5 に示した平面構造を決定した。表 2 に、 ^1H NMR および ^{13}C NMR スペクトルの化学シフト値を、図 4 に ^1H NMR スペクトルを示す。なお、表 2 の No. は、(1) 式に付した番号に対応する。また、図 5 に、平面構造、二次元 NMR スペクトルの手法である $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY スペクトルおよび HMBC スペクトルにおいて観測された相関データを示す。

30

【 0 0 2 6 】

【表 2】

No.	TD-1(CDCl ₃)		TD-2(CD ₃ OD)	
	¹ H NMR	¹³ C NMR	¹ H NMR	¹³ C NMR
1	2.21 m 2.52 dd (13.8, 5.1)	47.2	2.13 m 2.44 dd (12.8, 5.4)	49.2
2	3.59 m	71.3	3.47 ddd (12.0, 9.3, 5.4)	72.2
3	3.13 d (9.2)	82.5	3.00 d (9.3)	83.0
4		40.8		41.9
5	2.04 m	50.1	2.04 m	51.1
6	1.25 m 1.38 m	25.6	1.39 m 1.73 m	26.8
7	1.25 m 1.45 m	29.8	1.13 m 2.17 m	31.1
8	2.40 m	45.6	2.36 m	47.7
9		137.7		138.6
10		134.8		135.1
11	5.78 t-like (2.4)	129.1	5.77 s	131.8
12	2.31 m 2.35 m	37.8	2.28 m 2.36 m	37.9
13		45.0		46.1
14		65.7		64.0
15	1.65 m 2.68 dd (13.8, 7.8)	34.0	1.21 dd (13.2, 8.4) 2.67 dd (13.2, 4.2)	38.5
16	4.85 m	82.1	4.28 m	71.8
17	2.31 m	51.0	1.50 dd (11.4, 6.6)	55.1
18	1.07 s	18.9	1.15 s	18.7
19	6.10 s	130.2	6.07 s	131.1
20	2.68 m	43.0	2.57 m	ND
21		178.4		ND
22	1.65 m 2.04 m	25.9	* 1.42 m 1.90 m	*33.1
23	2.14 m 2.19 m	27.1	* 1.95 m 2.04 m	*27.4
24	5.07 t-like (7.2)	123.0	5.13 t-like (5.7)	125.9
25		133.5		131.6
26	1.70 s	25.8	1.64 s	25.7
27	1.60 s	17.9	1.58 s	17.7
28	9.65 s	208.1	9.58 s	210.3
29	1.04 s	24.7	1.00 s	25.1
30	0.77 s	14.9	0.72 s	15.0

* Assignments may be interchangeable.
ND...Not detected.

【 0 0 2 7 】

また、二次元 NMR スペクトルの手法の一つである NOESY スペクトルを測定した。図 6 に、NOESY スペクトルにおいて観測された相関データを示す。

【 0 0 2 8 】

上記のデータから、相対立体配置を含めたツピフェール A の化学構造を下記 (1) 式のように決定した。この結果、9, 10 - seco - cycloartane 骨格を有する化合物であることが明らかとなった。

【 0 0 2 9 】

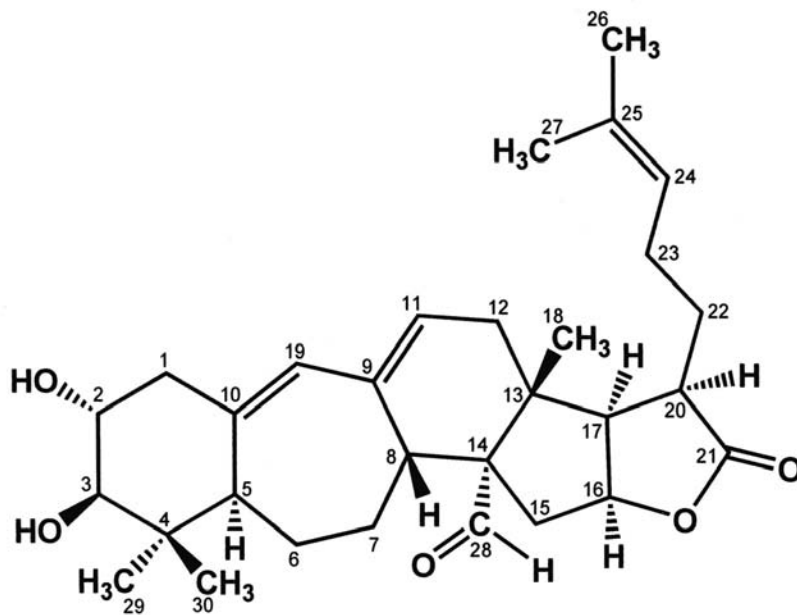
10

20

30

40

【化3】



(1)

10

20

【0030】

次に、ツビフェラルBの構造解析を行った。具体的には、 ^1H NMR, ^{13}C NMR、 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY, HMQCスペクトル、およびHMBCスペクトルの測定をした。表2に、 ^1H NMRおよび ^{13}C NMRスペクトルの化学シフト値を、図7に ^1H NMRスペクトルを示す。なお、表2のNo.は、(2)式に付した番号に対応する。

【0031】

また、ツビフェラルBの測定結果をツビフェラルAと比較すると次の知見が得られた。

(i) UVスペクトルパターンおよび一次元NMRスペクトルがツビフェラルAのものと類似していたことから、ツビフェラルBはツビフェラルAの類縁体であることが考えられた。

30

(ii) ツビフェラルBの分子式がツビフェラルAよりも H_2O が1分子増えたことと、ツビフェラルAよりもツビフェラルBの極性が高くなっていることから、ツビフェラルAのラクトン部分が開環し、カルボン酸と水酸基になったのではないかと推測された。

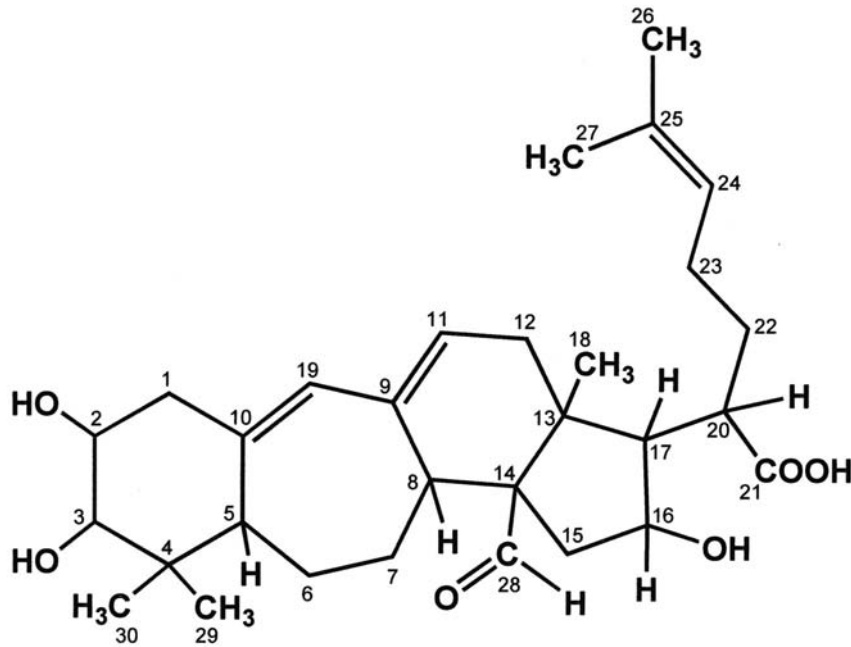
【0032】

この知見及び各種NMRスペクトルの解析によって導き出された部分構造より、ツビフェラルBの平面構造を図8および下記式(2)のように推定した。なお、図8は、ツビフェラルBの平面構造、 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSYスペクトルおよびHMBCスペクトルにおいて観測された相関データを示す図である。

40

【0033】

【化4】



10

20

【0034】

また上記の知見を確かめるべく、ツピフェラルAを2NのKOHにて室温(25℃)で終夜(約12時間)攪拌し、TLC分析を行ったところ、ツピフェラルBの生成を確認でき、上記の知見の信頼性が極めて高いことを確認した。なおTLC分析の条件は、各展開溶媒で分取された成分1A~1Fについて行った条件と同じくODS-TLC, 90% MeOHとした。

【0035】

また、上記ツピフェラルA及びBの効果を確かめるべく、これらのヒト腫瘍細胞に対する細胞毒性試験を行った。

細胞毒性試験は、細胞を培養した後細胞生存率をMMT法によって決定した。なおここにおいて細胞の培養は、96穴プレート1ウェルあたり細胞195μlを播採し、これをCO₂インキュベータ内で5%CO₂-95%空気の雰囲気下、37℃で24時間培養し、サンプル溶液5μl加え、CO₂インキュベータ内で更に37℃で72時間培養することにより行った。

30

またこの試験において用いた腫瘍細胞はピンクリスチン耐性のヒト上皮癌細胞KB/VJ-300、ヒト前立腺癌細胞LNCaPであり、かつそれらはいずれも10%ウシ胎児血清を含むMEM培地中で維持されているものを用いた。なお上記96穴プレートに播採した細胞の濃度は、KB/VJ-300細胞の場合 1×10^4 cells/ml、LNCaP細胞の場合 2×10^4 cells/mlとした。また本試験は、KB/VJ-300細胞に対しては、100ng/mlのピンクリスチン存在下(VCR(+))及び非存在下(VCR(-))で行っている。本実験の陽性対照としてベラパミル、シスプラチンを用いた。この結果を表3に示す。

40

【表 3】

	KB/VJ-300		LNCaP
	VCR(+)	VCR(-)	
ツビフェラルA	2.7	>12.5	13.2
ツビフェラルB	>12.5	>12.5	>12.5
ベラパミル	1.1	>25	-
シスプラチン	-	-	1.5

10

上記の結果から、ツビフェラルAは、ピンクリスチン耐性のKB/VJ-300に対し、ピンクリスチン存在下においてIC₅₀値2.7mlで細胞毒性を示した。

以上、この結果によりツビフェラルAがピンクリスチン耐性克服作用を持つことを示すことが確かめられた。

【図面の簡単な説明】

【0036】

20

【図1】実施例の分画フロー及び各分取成分の収量を示す図である。

【図2】ツビフェラルAのメタノール中でのUV吸収スペクトルの測定結果である。

【図3】ツビフェラルBのメタノール中でのUV吸収スペクトルの測定結果である。

【図4】ツビフェラルAの¹H NMRスペクトルの測定結果である。

【図5】ツビフェラルAの平面構造、¹H - ¹H COSYスペクトル及びHMBCスペクトルにおいて観測された相関データを示す図である。

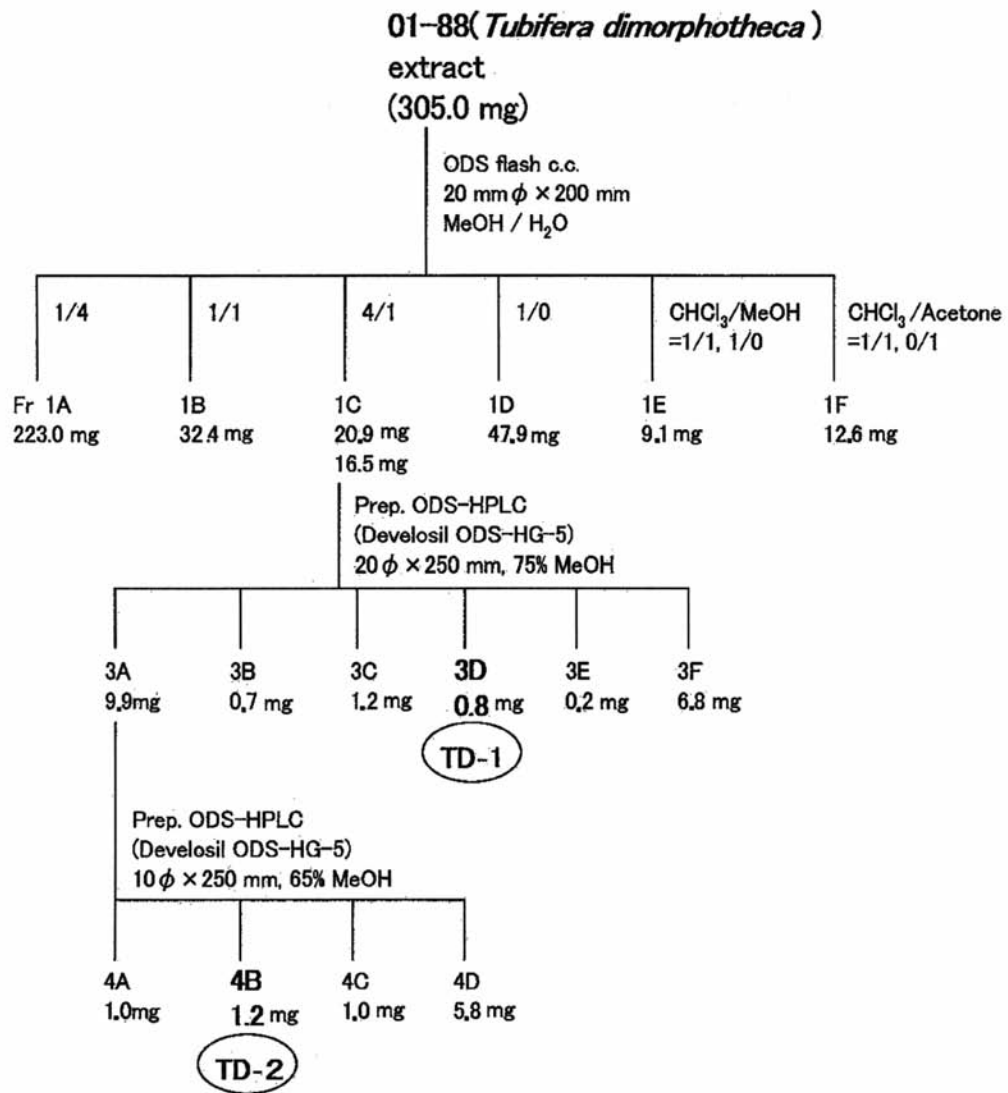
【図6】ツビフェラルAのNOESYスペクトルにおいて観測された相関データを示す図である。

【図7】ツビフェラルBの¹H NMRスペクトルの測定結果である。

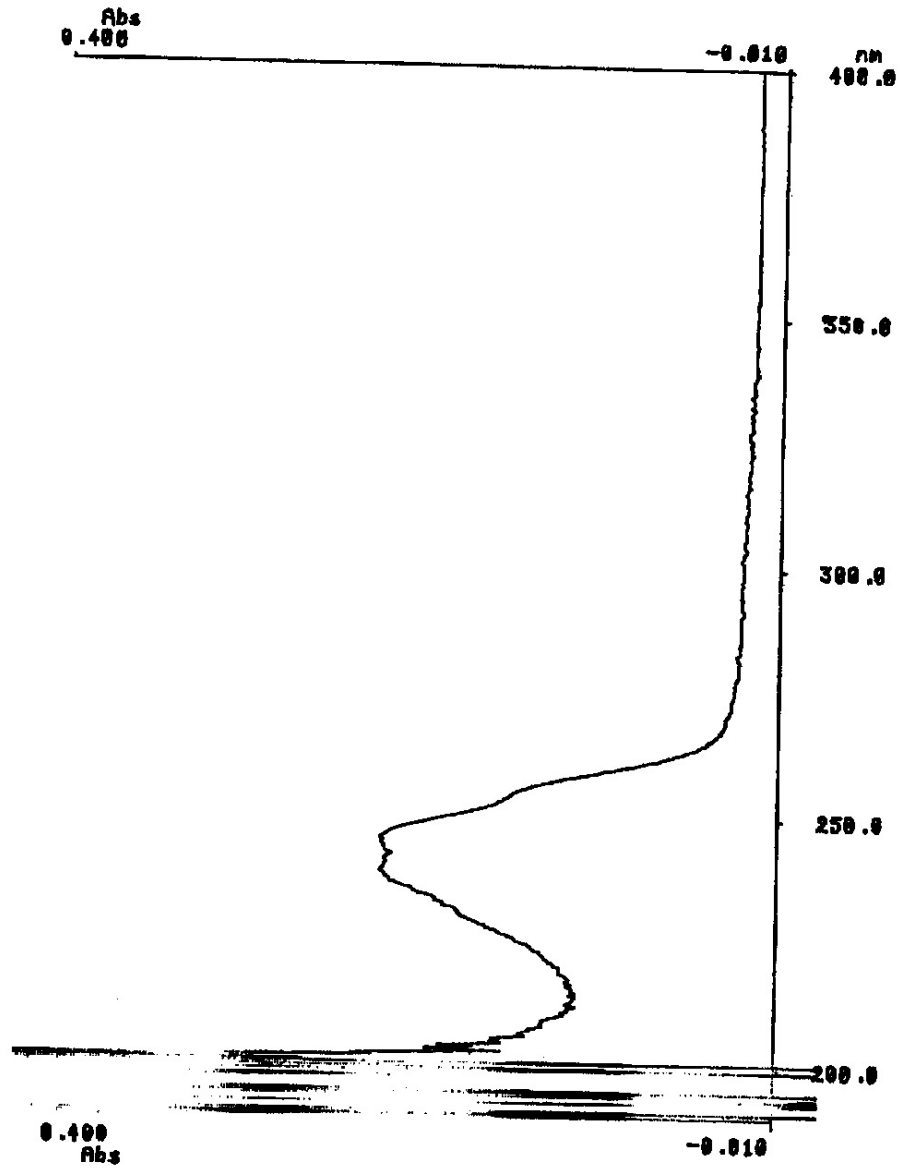
【図8】ツビフェラルBの平面構造、¹H - ¹H COSYスペクトルおよびHMBCスペクトルにおいて観測された相関データを示す図である。

30

【 1 】

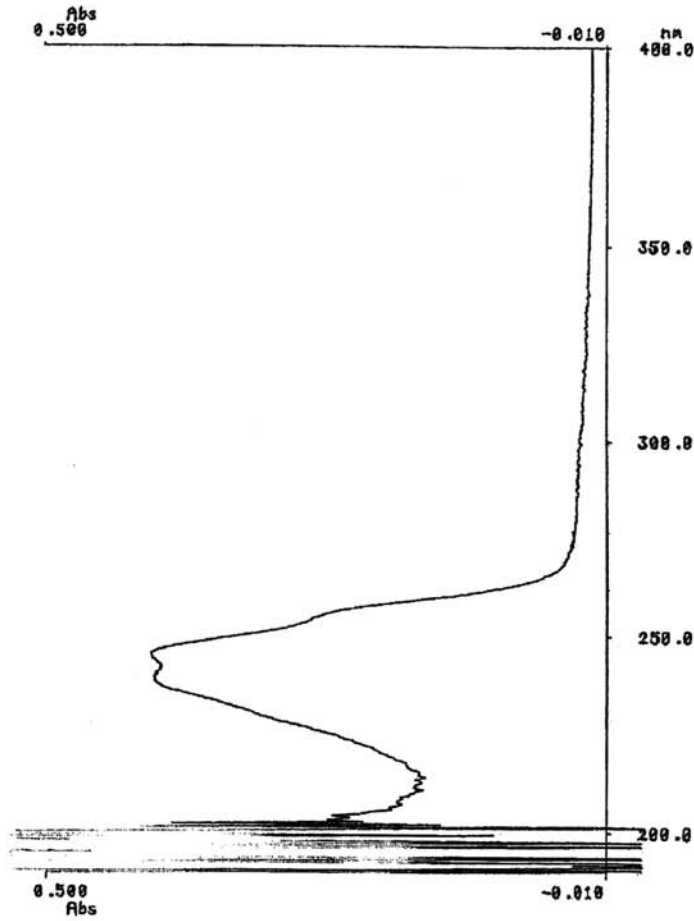


【 2 】



TITLE : TD-1 1.24×10^{-6} mol / L 9:11 PM 1/16/4

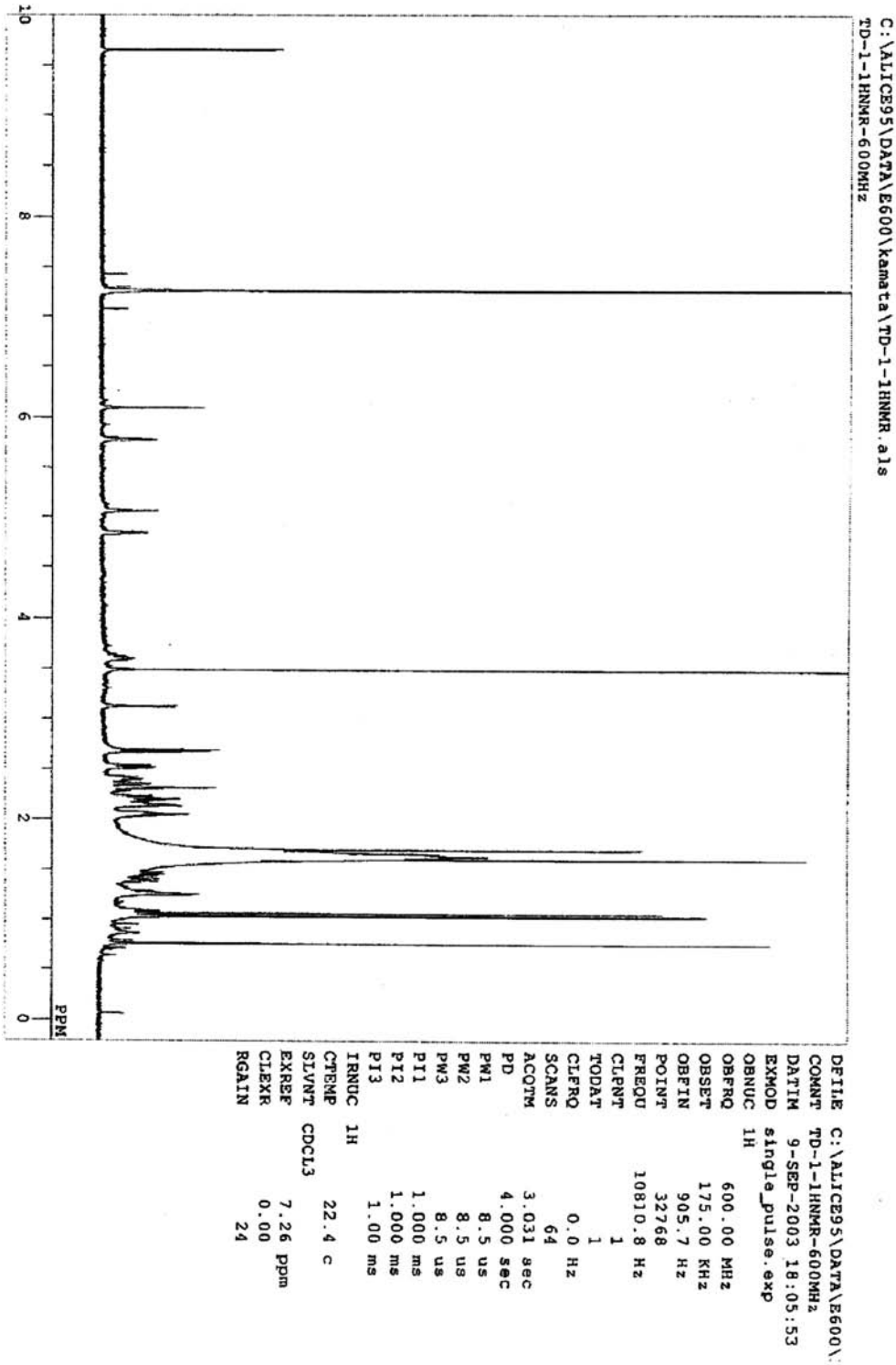
【 3 】



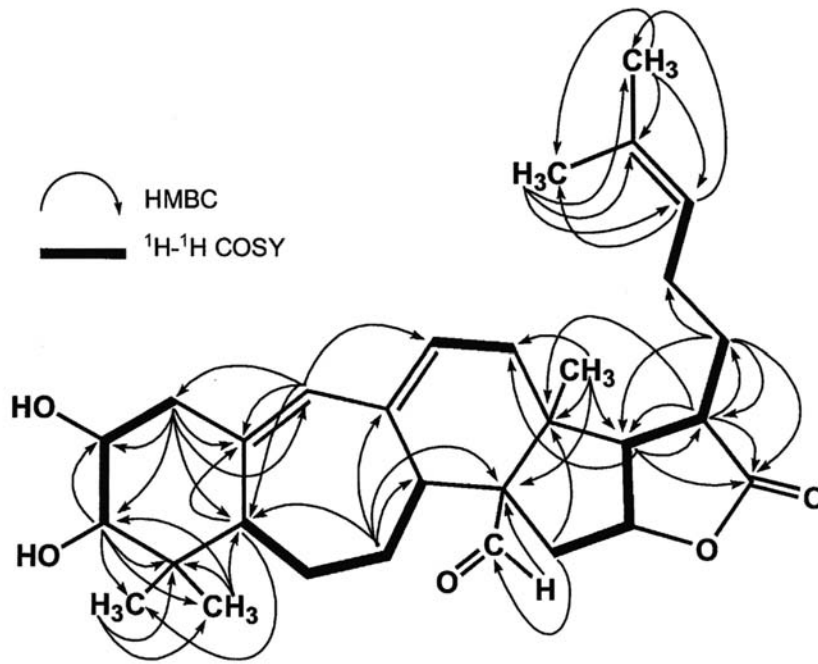
9:30 PM 1/16/4

TITLE : TD-2 2.0×10^{-5} mol / L

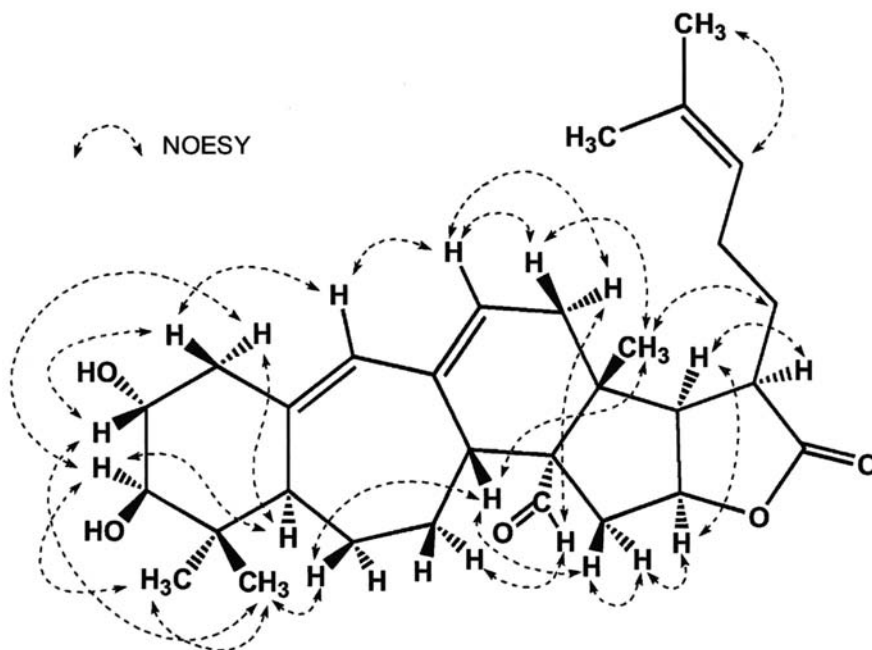
【 4 】



【 5 】



【 6 】



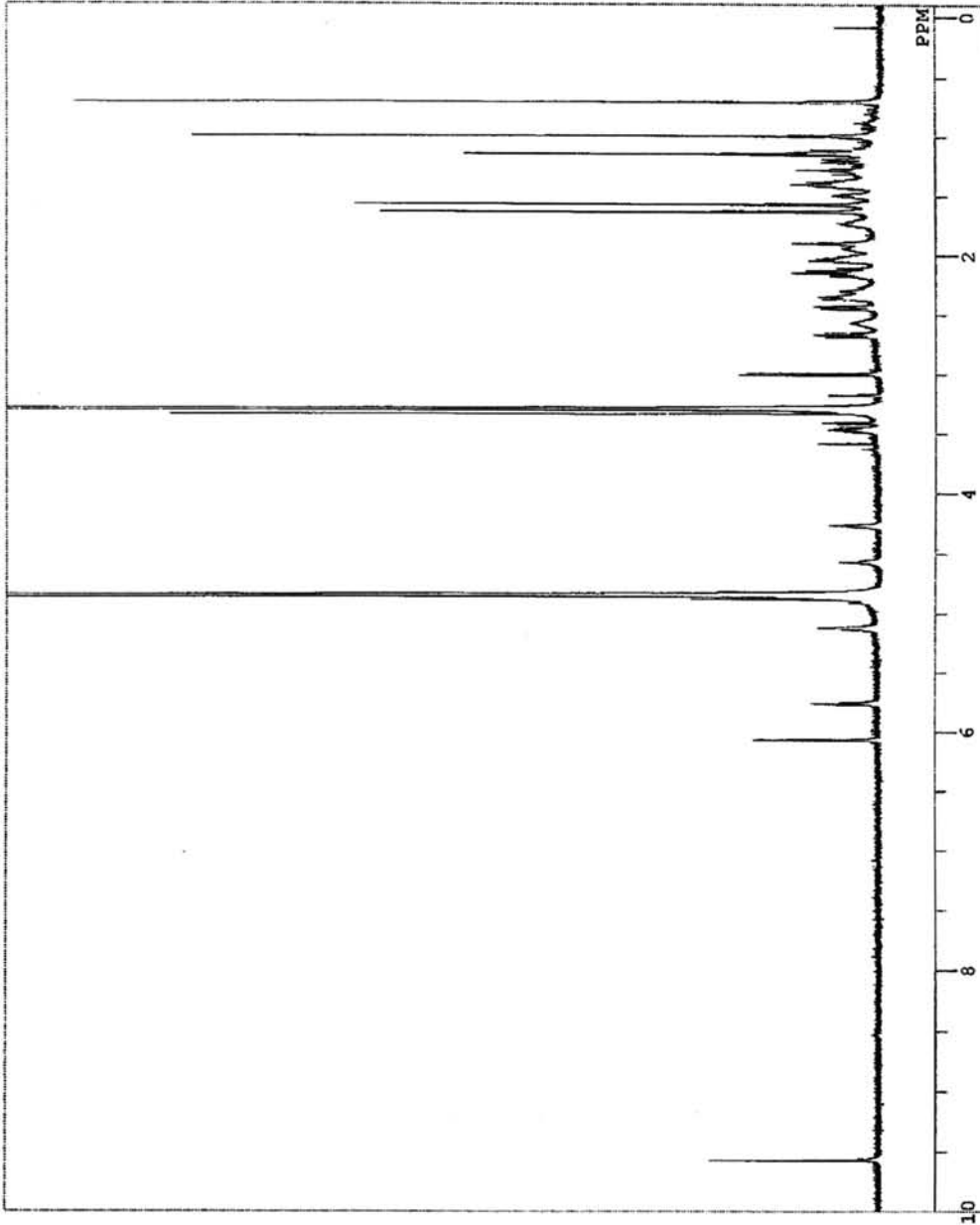
【 7 】

C:\ALICE95\DATA\E600\kamata\TD-2-1HNMR.als
TD-2-1HNMR-600MHZ

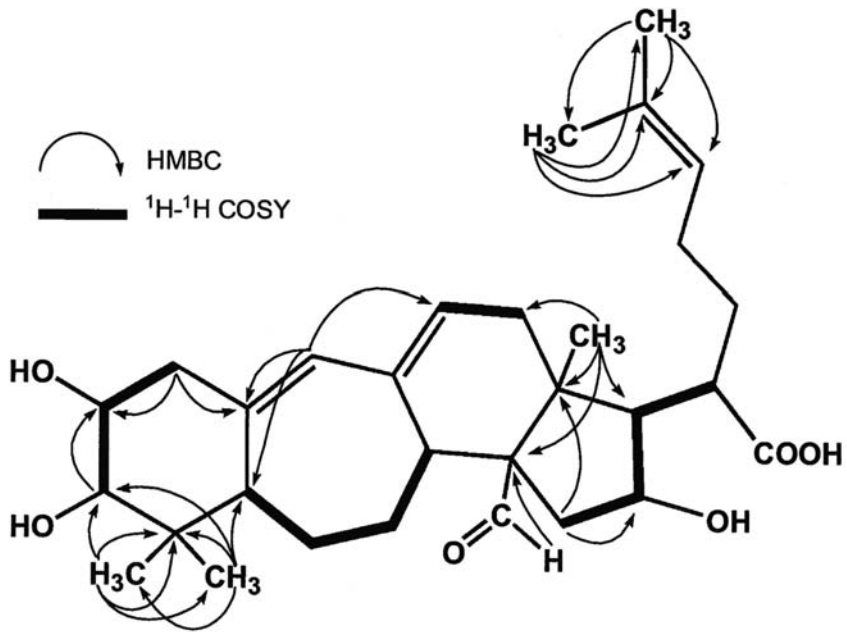
```

DFILE C:\ALICE95\DATA\E600\
COMNT TD-2-1HNMR-600MHZ
DATIM 25-OCT-2003 14:03:05
EXMOD single_pulse.exp
OBNUC 1H
OBFRQ 600.00 MHz
OBSET 175.00 KHz
OBFIN 905.7 Hz
POINT 32768
FREQU 9009.0 Hz
CLPNT 1
TODAT 1
CLFRQ 0.0 Hz
SCANS 32
ACQTM 3.637 sec
PD 4.000 sec
PW1 8.5 us
PW2 8.5 us
PW3 8.5 us
PI1 1.000 ms
PI2 1.000 ms
PI3 1.00 ms
IRNUC 1H
CTEMP 23.0 C
SLVNT CD3OD
EXREF 3.30 ppm
CLEXR 0.00
RGAIN 21

```



【 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 D 307/93 (2006.01) C 0 7 D 307/93

(56)参考文献 天然有機化合物討論会講演要旨集, 2 0 0 4年 9月 1日, 46, 299-304
Tetrahedron, 2 0 0 4年 1 0月 2 5日, 60(44), 9835-9839
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry, 1 9 7 9年, (1), 7-14

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 C 5 9 / 7 4
C 0 7 D 3 0 7 / 9 3
CA/REGISTRY(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)