

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/053232

発行日 平成26年2月24日(2014.2.24)

(43) 国際公開日 平成24年4月26日(2012.4.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C07C 59/82 (2006.01)</b>	C07C 59/82 CSP	4C206
<b>A61K 31/202 (2006.01)</b>	A61K 31/202	4H006

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

出願番号	特願2011-517547 (P2011-517547)	(71) 出願人	399109333 学校法人青山学院 東京都渋谷区渋谷4丁目4番25号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/055292	(74) 代理人	100112427 弁理士 藤本 芳洋
(22) 国際出願日	平成23年3月8日(2011.3.8)	(72) 発明者	木村 純二 神奈川県相模原市中央区淵野辺5-10-1 青山学院大学内
(11) 特許番号	特許第4762381号 (P4762381)	(72) 発明者	堀江 将平 東京都練馬区石神井台1-6-12 306号室
(45) 特許公報発行日	平成23年8月31日(2011.8.31)	(72) 発明者	丸島 春美 神奈川県横須賀市安針台11-4
(31) 優先権主張番号	特願2010-234923 (P2010-234923)		
(32) 優先日	平成22年10月19日(2010.10.19)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

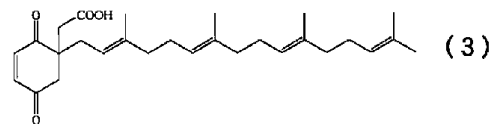
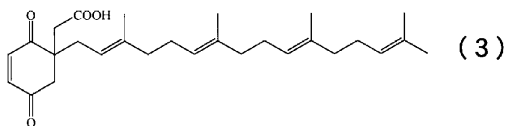
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗リーシュマニア化合物及び抗リーシュマニア薬

(57) 【要約】

式(3)

【化4】



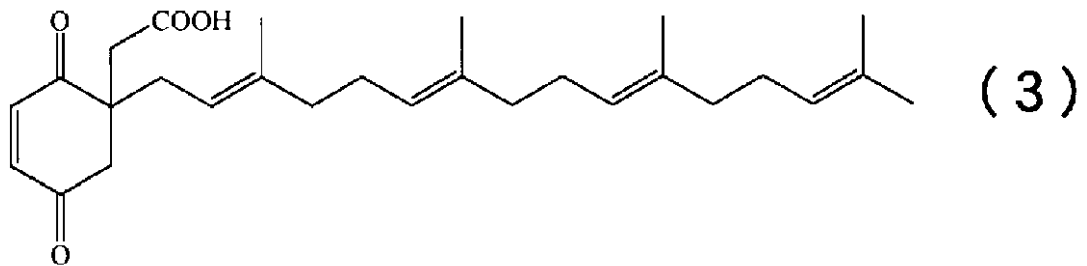
で表される抗リーシュマニア化合物。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 (3)

## 【化 3】



10

で表される抗リーシュマニア化合物。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の抗リーシュマニア化合物またはその薬理上許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする抗リーシュマニア薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

## 【0001】

本発明は、高い抗リーシュマニア活性を有する抗リーシュマニア化合物及び抗リーシュマニア薬に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

リーシュマニア症は、リーシュマニア原虫に感染することを原因として発症する感染症であり、WHOにより六大熱帯病の 1 つに指定されている。吸血昆虫であるサシチョウバエを媒介とし、サシチョウバエの吸血時に体内にリーシュマニア原虫が侵入することにより感染する。リーシュマニア症の症状は軽いものから重いものまでであるが、主に治療薬として用いられている 5 価のアンチモンは強い副作用を引き起こすことが知られている。従

30

って、副作用のリスクの低い新薬が求められる。また、副作用を抑制した薬として、AmphotericinB (AmBisome) があるが、薬価が高いという問題があった。

## 【0003】

一方で、海藻由来の代謝物は、抗リーシュマニア活性を示すことが報告されている（例えば、非特許文献 1 参照）。しかし、この文献においては海藻由来のどの化合物が抗リーシュマニア活性を有するかについて化合物の特定は行われていない。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0004】

【非特許文献 1】Y. Freile-Pelegrin, D. Robledo, M. J. Chan-Bacab, B. O. Orrtega-Morales, "Antileishmanial properties of tropical marine algae extract", *Fitoterapia*, (Holland), Elsevier, 2008, 79, p. 374-377

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明者らは、鋭意検討の結果、褐藻類ヒバマタ目ホンダワラ科アズマネジモク (*Sargassum yamadae*) に着目し、抽出物の分画を行ったところ高い抗リーシュマニア活性を有することを発見し、本発明を完成するに至った。

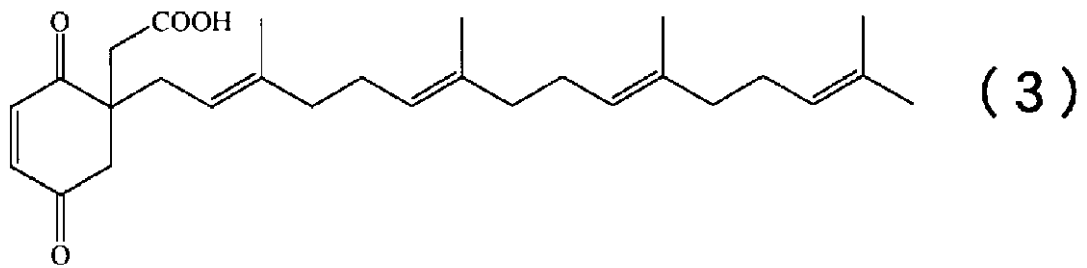
## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

50

即ち、本発明に係る抗リーシュマニア化合物は、  
式(3)

【化1】



10

で表される。

【0007】

また、本発明に係る抗リーシュマニア薬は、式(3)で表される化合物及びその薬理上許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、高い抗リーシュマニア活性を示す抗リーシュマニア化合物及び抗リーシュマニア薬を提供することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本発明の実施例に係る化合物の分離操作(1回目)の手順を示す図である。

【図2】本発明の実施例に係る化合物の分離操作(1回目)の手順を示す図である。

【図3】本発明の実施例に係る化合物の分離操作(1回目)の手順を示す図である。

【図4】本発明の実施例に係る化合物の分離操作(1回目)の手順を示す図である。

【図5】本発明の実施例に係る化合物の分離操作(1回目)の手順を示す図である。

【図6】本発明の実施例に係る化合物の分離操作(2回目)の手順を示す図である。

【図7】本発明の実施例に係る化合物の分離操作(2回目)の手順を示す図である。

30

【図8】本発明の実施例に係る化合物の分離操作(2回目)の手順を示す図である。

【図9】本発明の実施例に係る *in vitro* 抗リーシュマニア活性測定の結果を示すグラフである。

【図10】本発明の実施例に係る *in vivo* 抗リーシュマニア活性測定の結果を示すグラフである。

【図11】本発明の実施例に係る *in vivo* 抗リーシュマニア活性測定の結果を示す図である。

【図12】本発明の実施例に係る *in vivo* 抗リーシュマニア活性測定の結果を示す図である。

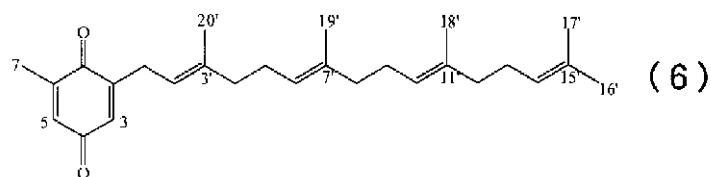
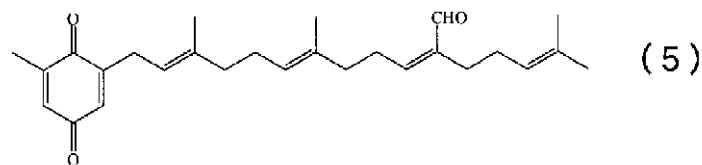
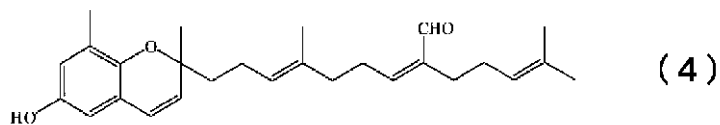
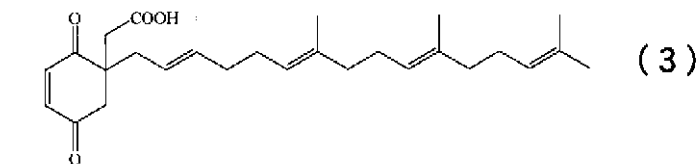
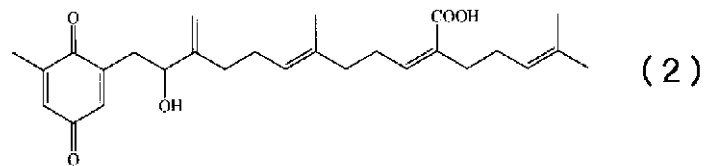
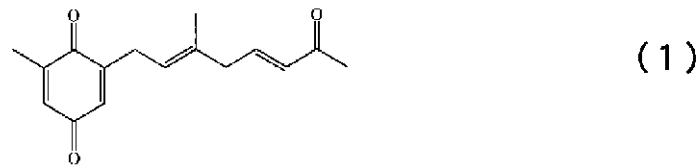
【発明を実施するための形態】

40

【0010】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態に係る抗リーシュマニア化合物及び抗リーシュマニア薬について説明する。本発明に係る抗リーシュマニア化合物は式(1)~(6)で表される化合物のうち少なくとも1つからなり、本発明に係る抗リーシュマニア薬は、式(1)~(6)で表される化合物のうち少なくとも1つを有効成分として含有する。

## 【化 2】



10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 1 】

式(1)～(6)で表される化合物のうちの何れかを回収するには、褐藻等の藻に対して、当該化合物の理化学的性質を考慮して、代謝物を採取するのに通常用いられる分離、精製的手段を適宜利用すればよい。例えば、藻に対して有機溶剤、好ましくはクロロホルム-メタノールの等量混合溶媒で抽出操作を行う。次に得られた抽出液からさらにジクロロメタン等の有機溶剤で化合物を抽出してもよいし、各種のクロマトグラフィーを用いて化合物を吸着、溶出させてもよい。さらに必要に応じてさらに精製操作を行って、所望の純度を有する化合物を回収することができる。クロマトグラフィーにおいては、慣用の無機及び有機の担体、例えばシリカゲル、ポリスチレン樹脂などを担体として用いることができる。

## 【 0 0 1 2 】

式(1)～(6)で表される化合物は、例えば医薬品分野の抗原虫薬、特に抗リーシュマニア薬として有用である。式(1)～(6)の何れかで表される化合物は、単独で用いてもよいし、又は一般に製剤上許容される添加剤と共に混和し、製剤化してもよい。また、投与形態としては、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤、エキス剤等の経口剤を用いた投与形態または、注射剤、液剤、

坐剤、軟膏剤、貼付剤、パップ剤、ローション剤等の非経口剤を用いた投与形態等が挙げられるが、特に制限はなく、治療目的等に応じて適宜選択することができる。

【0013】

また、錠剤、顆粒剤、丸剤、カプセル剤、散剤の場合には、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等の添加剤を含有させることができる。賦形剤としては、デンプン、カルボキシメチルセルロース、白糖、デキストリン、コーンスターチ等を挙げることができる。

【0014】

結合剤としては、結晶セルロース、結晶セルロース・カルメロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルメロースナトリウム、エチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、デキストリン、アルファー化デンプン、部分アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、プルラン、ポリビニルピロリドン、アミノアルキルメタクリレートコポリマーE、アミノアルキルメタクリレートコポリマーRS、メタクリル酸コポリマーL、メタクリル酸コポリマー、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルアルコール、アラビアゴム、アラビアゴム末、寒天、ゼラチン、白色セラック、トラガント、精製白糖、マクロゴールが挙げられる。

10

【0015】

崩壊剤としては、結晶セルロース、メチルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロース、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、部分アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、トラガントが挙げられる。

20

【0016】

滑沢剤としては、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、含水二酸化ケイ素、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、乾燥水酸化アルミニウムゲル、タルク、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウム、無水リン酸水素カルシウム、ショ糖脂肪酸エステル、ロウ類、水素添加植物油、ポリエチレングリコールが挙げられる。

30

【0017】

また、液剤、シロップ剤、懸濁剤、乳剤、エリキシル剤の場合には、水や植物油等の一般的に用いられる不活性な希釈剤の他、着色剤、矯味剤、着香剤等を添加剤として含有させてもよい。

【0018】

また、注射剤の場合には、懸濁液、乳濁液、用時溶解剤等の添加剤を含有させることができる。また、軟膏剤、坐剤の場合には、脂肪、脂肪油、ラノリン、ワセリン、パラフィン、ろう、樹脂、プラスチック、基剤、グリコール類、高級アルコール、水、乳化剤、懸濁化剤等を添加剤として含有させることができる。また、パップ剤の場合にはグリセリン、水、水溶性高分子、吸水性高分子等を添加物として含有させることができる。また、ローション剤の場合には、溶剤、乳化剤、懸濁化剤等を添加剤として含有させることができる。

40

【0019】

本発明の抗リュウシュマニア化合物は、食品、チューインガム、飲料等に添加して、いわゆる特定保健用食品（例えば、抗リュウシュマニア食品）やサプリメント等に含有させることもできる。

【0020】

なお、上述の式(1)～(6)で表される化合物は、これらの化合物の薬理上許容される塩を含む概念である。すなわち、本発明は、ヒト又は動物の体内で代謝されることによ

50

って上記化合物及びアミドに変化して薬理活性を示す生化学的前駆物質を含む。本発明において、薬理上許容される塩とは、上記の化合物を酸または塩基で処理することにより得られる塩であって、著しい毒性を有さず、医薬として使用され得る塩をいう。このような酸付加塩の例としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸等の無機酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸等の有機酸等による付加塩があげられ、塩基による塩としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等のアルカリ土類金属水酸化物、グアニジン、トリエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン等の有機塩基による塩があげられる。

#### 【実施例】

##### 【0021】

以下、本発明について実施例を用いてより具体的に説明する。

##### 【0022】

1. 式(1)~(6)で表される化合物の分離操作

##### (1) 脂質成分の抽出

褐藻類ヒバマタ目ホンダワラ科アズマネジモク (*Sargassum yamadae*) (294.4g) をメタノールとクロロホルムの等量混合溶媒 (1.4L) に1日浸漬し、吸引濾過により残渣を除き脂質成分を抽出した。さらに、この残渣についてメタノールとクロロホルムの等量混合溶媒 (1.4L) に1日浸漬し、吸引濾過を行うことにより脂質成分を抽出した。溶媒を減圧下で除去し、得られた抽出物 (31.2g) を水とクロロホルムにより二層分配し、脂質成分 (23.8g) を得た。なお、ネジモクは採取後人工海水により洗浄して恒温除湿室で乾燥し、粉砕後実験に使用するまで -20℃ で保存した。

##### 【0023】

##### (2) 分離操作 1 回目

(1) に示す操作により得られた脂質成分のうち、5.14g を分別し、図1に示すように酢酸エチル-ヘキサン系の溶媒の割合を変えながらオープンカラムクロマトグラフィー (7×45cm) により A~P の16の画分に分けた。

##### 【0024】

これらのうち、図2~5に示すように画分 E、K、N 及び O について、さらにオープンカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、及び酢酸エチル-ヘキサン混合溶出液を用いた HPLC により、数種の化合物を分離した。

##### 【0025】

図2に示すように画分 E について薄層クロマトグラフィーを行い、数種の画分を得た。

##### 【0026】

このうち、画分 f から式(5)で表される化合物を得た。また、画分 e について HPLC を行い保持時間 18 分に式(5)で表される化合物を得た。なお、図2~8においては画分名の下段に、得られた画分の質量 (mg) を示す。また、上述の式(1)~(6)で表される化合物の何れかである場合にはその化合物の式の番号を太字で示している。また、HPLC を行った際に得られた画分については上から順に保持時間、得られた化合物の質量 (mg) を示し、更に上述の式(1)~(6)で表される化合物の何れかである場合にはその化合物の式の番号を太字で示している。

##### 【0027】

また、図3に示すように画分 K について20%酢酸エチル-ヘキサン溶出液を用いて HPLC を行い、保持時間 28 分にサルガキノン酸 (*sargaquinoic acid*) を、保持時間 31 分に式(1)で表される化合物を得た。また、図4に示すように画分 N について薄層クロマトグラフィー及び20%酢酸エチル-ヘキサン溶出液を用いた HPLC を行い、HPLC において保持時間 28 分に式(2)で表される化合物 (HREIMS  $m/z$  440.2560 [M+],  $C_{27}H_{36}O_5$  ( $-0.3$  mmu)) を得た。また、図5に示すように画分 O について55%酢酸エチル-ヘキサン溶出液を用いて HPLC を行い、保持時間 28 分に式(3)で表される化合物 (HREIMS  $m/z$  440.2934 [M+],  $C_{28}H_{40}O_4$  ( $+0.8$  mmu)) を得た。

##### 【0028】

10

20

30

40

50

## (3) 分離操作 2 回目

上述の脂質成分の抽出操作により得られた脂質成分のうち分離操作 1 回目で使用しなかった残りの 18.6g について酢酸エチル - ヘキサン系の溶媒の割合を変えながら図 6 に示すようにオープンカラムクロマトグラフィー ( 7 × 45cm ) により A' ~ O' の 15 の画分に分けた。

## 【0029】

図 7 に示すように得られた画分のうち画分 C' 及び画分 D' を合わせ Sep-Pak による抽出を行った。0.5% 酢酸エチル - ヘキサン混合溶出液を用いて抽出した画分について 1% 酢酸エチル - ヘキサン溶出液を用いて HPLC を行い保持時間 182 分に式 (6) で表される化合物を得た。また、1% 酢酸エチル - ヘキサン混合溶出液を用いて抽出した画分について 7% 酢酸エチル - ヘキサン溶出液を用いて HPLC を行い保持時間 108 分に式 (5) で表される化合物を得た。

10

## 【0030】

また、図 8 に示すように画分 E' について薄層クロマトグラフィーを行い、さらに 20% 酢酸エチル - ヘキサン混合溶出液を用いて HPLC を行った。保持時間 40 分に式 (5) で表される化合物を、保持時間 76 分に式 (4) で表される化合物 (EIMS  $m/z$  408  $C_{27}H_{36}O_3$  [M+],  $m/z$  175 [M -  $C_{15}H_{25}O$ ]) をそれぞれ得た。

## 【0031】

得られた化合物については  $^1H$  - 及び  $^{13}C$  - NMR 等により分子構造の解析を行った。NMR スペクトルのデータを下表に示す。なお、式 (1) で表される化合物の NMR データは、Bull. Chem. Soc. Jpn., 2008, 81(9) 1125-1130 に発表した NMR データと共に示し、式 (4) で表される化合物の NMR データは、構造類似のサルガクロメノール (sargachromenol) の NMR データと共に示し、式 (5) 及び式 (6) で表される化合物の NMR データはサルガキノン酸 (sargaquinoic acid) の NMR データと共に示した。

20

## 【表 1】

式(1)で表される化合物のNMRデータ

#	(1)			literature		
	$\delta_H$	$J$ (Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$	$J$ (Hz)	
1			187.8			
2			147.8			
3	6.47	d	1.8	132.5	6.47	m
4			187.8			
5	6.56	m		133.2	6.57	dq
6			146.0			
7	2.07	d	1.4	16.0	2.07	d
1'	3.17	d	7.3	27.8	3.16	br. d
2'	5.24	br. d	7.3	121.2	5.24	tq
3'			136.2			
4'	2.94	d	7.3	42.4	2.94	br. d
5'	6.75	td	6.9, 16.0	145.0	6.75	td
6'	6.09	br. d		132.5	6.09	dt
7'			198.3			
8'	2.27			27.1	2.26	s
9'	1.67	br. s		16.4	1.67	br. s

\*: not determined

30

40

【表 2】

式(2)で表される化合物のNMRデータ

#	$\delta_C$	$\delta_H$		$J$ (Hz)	HMBC (C)	
1	187.7					
2	145.8					
3	134.6	6.64	br. d	2.7		
4	188.4					
5	133.3	6.57	m			
6	145.9					
7	16.1	2.05	d	1.4	1,5,6	10
1'	36.0	2.78	dd	14.2, 3.7	2,3,2'	
		2.54	dd	14.2, 7.1		
2'	73.3	4.26	dd	8.7, 3.7	2'	
3'	150.8					
4'	26.4	2.18	overlapped		5'	
5'	31.7	2.20	overlapped		4', 20'	
6'	124.3	5.15	dq	6.4, 0.9		
7'	135.0					
8'	39.0	2.08	overlapped		6'	20
9'	28.3	2.58	q	7.3	10', 11'	
10'	144.0	5.95	t	7.3	8', 12'	
11'	130.5					
12'	34.6	2.27	t	7.8	13', 14'	
13'	27.9	2.14	overlapped			
14'	123.4	5.10	overlapped			
15'	132.3					
16'	25.6	1.68	s		17'	
17'	17.7	1.58	s		16'	
18'	166.0					
19'	16.1	1.62	s		6', 7', 8'	30
20'	110.2	5.08	s		4'	
		4.90	s			



【表 3】

式(3)で表される化合物のNMRデータ

#	(3)				
	$\delta_C$	$\delta_H$		$J(\text{Hz})$	HMBC(C)
1	200.7				
2	50.2				
3	46.5	2.72	d	16.5	1, 2, 4, 5
		3.28	d	16.5	1, 2, 4, 5
4	197.4				
5	140.8	6.69	d	10.5	4, 6
6	139.9	6.72	d	10.5	1, 2, 5
1'	38.2	2.21	dd	7.8, 13.7	1, 2, 2', 3'
		2.31	dd	8.2, 13.7	1, 2, 2', 3'
2'	116.7	4.95	dd	7.8, 8.2	4', 20'
3'	141.6				
4'	39.7	1.97	m		2', 3', 5', 6'
5'	26.7	2.04	m		3', 4', 6', 7'
6'	124.6	5.06	t	6.9	4'
7'	135.5				
8'	39.6	1.98	m		6', 7', 9', 19'
9'	26.6	2.05	m		8', 10', 11'
10'	124.1	5.10	t	6.9	8', 18'
11'	135.0				
12'	39.9	1.95	m		10', 11', 13', 18'
13'	26.3	2.05	m		11', 12', 14', 15'
14'	124.4	5.10	t	6.9	12', 16', 17'
15'	131.3				
16'	25.7	1.68	s		14', 15', 17'
17'	17.6	1.60	s		14', 15', 16'
18'	16.0	1.58	s		10'
19'	16.0	1.58	s		7'
20'	16.4	1.53	s		3'
21'	39.7	2.33	d	17.9	1, 2, 22'
		3.09	d	17.9	
22'	176.0				

10

20

30

【表 4】

式(4)で表される化合物のNMRデータ

#	(4)				sargachromenol	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$J$ (Hz)	HMBC (C)	$\delta_C$	$\delta_H$
2	77.7				77.6	
3	130.6	5.57 d	9.6	2, 4a	130.4	5.57
4	122.9	6.26 d	9.6	2, 4a, 5, 8a	122.9	6.24
4a	121.3				121.2	
5	110.3	6.33 d	2.7	4, 7, 8a	110.3	6.32
6	148.5				148.9	
7	117.1	6.47 d	2.7	5, 8a, 9	117.1	6.48
8	126.3				126.1	
8a	144.9				144.5	
9	15.5	2.14 s		7, 8, 8a	15.4	2.13
10	25.9	1.37 s		2, 3, 1'	25.8	1.36
1'	40.7	1.68 overlapped		2, 10, 2'	40.7	1.68
2'	22.6	2.15 overlapped		1', 3'	22.5	2.1 *
3'	125.5	5.16 br. t	7.3	2', 5', 16'	124.9	5.15
4'	133.6				134.2	
5'	38.3	2.12 t	7.3	4', 6', 7', 16'	39.0	2.07
6'	27.0	2.43 br. q	7.3	4', 5', 7', 8'	28.0	2.60
7'	155.5	6.41 t	7.3	5', 6', 9', 15'	145.3	6.00
8'	143.2				130.6	
9'	24.2	2.25 br. t	7.8	7', 8', 10', 15'	34.4	2.27
10'	27.4	2.03 br. q	7.3	8', 9', 12'	27.8	2.13
11'	123.6	5.09 tt	7.3, 1.4	13', 14'	123.4	5.09
12'	133.6				132.1	
13'	25.7	1.67 s		11', 12', 14'	25.5	1.68
14'	17.6	1.56 s		11', 12', 13'	17.6	1.59
15'	195.2	9.34 s		8'	173.0	
16'	15.8	1.60 s		3', 4', 5'	15.6	1.58

\* : not determined

10

20

30

【表 5】

式(5)で表される化合物のNMRデータ

#	(5)					sargaquinoic acid	
	$\delta_C$	$\delta_H$		$J(\text{Hz})$	HMBC(C)	$\delta_C$	$\delta_H$
1	187.9					187.9	
2	154.9					148.4	
3	133.1	6.45	dt	2.3, 1.8	1or4	132.2	6.46
4	188.0					188.0	
5	133.9	6.54	br.q	1.4		133.1	6.54
6	148.4					145.9	
7	16.0	2.06	d	1.4	1,5,6	15.9	2.05
1'	—	3.13	d	7.3	1,2,3,2',3'	—	3.13
2'	118.2	5.15	br.t	7.3		118.0	5.15
3'	143.2					139.7	
4'	39.5	2.1	* overlapped			39.5	2.1
5'	25.7	2.1	* overlapped			26.3	2.1
6'	125.1	5.09	br.t	7.3		124.4	5.12
7'	139.7					134.5	
8'	38.3	2.1	* overlapped			39.0	2.1
9'	27.4	2.45	q	7.3	8',10',15'	28.1	2.60
10'	145.9	6.41	t	7.3	4',8'	145.1	6.01
11'	132.3					130.7	
12'	27.5	2.26	t	7.3	10',15'	34.5	2.26
13'	27.0	2.1	* overlapped			27.8	2.1
14'	123.6	5.15	br.t	7.3		123.4	5.09
15'	132.3					132.1	
16'	25.7	1.67	s		14',17'	25.6	1.67
17'	17.6	1.57	s		14',16'	17.6	1.58
18'	195.1	9.35	s			172.8	
19'	16.1	1.63	s		8'	15.8	1.60
20'	16.0	1.64	s		2',3'	16.0	1.62

\*: not determined

【表 6】

式(6)で表される化合物のNMRデータ

#	5			sargaquinoic acid				
	$\delta_H$		$J$ (Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$		$J$ (Hz)	HMBC (C)
1				187.9				
2				148.4				
3	6.46	dt	1.6, 2.8	132.2	6.46	dt	1.6, 2.8	4, 5, 1'
4				188.0				
5	6.54	dq	2.8, 1.4	133.1	6.54	dq	2.8, 1.4	3, 4, 7
6				145.9				
7	2.05	d	1.4	15.9	2.05	d	1.4	1, 5, 6
1'	3.13	br. d	7.3	27.5	3.13	br. d	7.3	1, 2, 3, 2', 3'
2'	5.15	overlapped		118.0	5.15	overlapped		1', 20'
3'				139.7				
4'	1.9~2.1 *	overlapped		39.5	2.1 *	overlapped		2', 3', 5'
5'	1.9~2.1 *	overlapped		26.3	2.1 *	overlapped		4', 6'
6'	5.1 *	overlapped		124.4	5.12	overlapped		5', 8', 19'
7'				134.5				
8'	1.9~2.1 *	overlapped		39.0	2.1 *	overlapped		7', 9'
9'	1.9~2.1 *	overlapped		28.1	2.60	dt	7.3, 7.3	8', 10', 11'
10'	5.1 *	overlapped		145.1	6.01	t	7.3	8', 9', 12', 18'
11'				130.7				
12'	1.9~2.1 *	overlapped		34.5	2.26	br. t	7.6	10', 11', 13', 14', 18'
13'	1.9~2.1 *	overlapped		27.8	2.1 *	overlapped		12', 14'
14'	5.1 *	overlapped		123.4	5.09	overlapped		13', 16', 17'
15'				132.1				
16'	1.67	br. s		25.6	1.67	br. s		14', 15', 17'
17'	1.6 *	br. s		17.6	1.58	br. s		14', 15', 16'
18'	1.6 *	br. s		172.8				
19'	1.6 *	br. s		15.8	1.60	br. s		6', 7', 8'
20'	1.62	br. s		16.0	1.62	br. s		2', 3', 4'

\*: not determined

10

20

30

## 【 0 0 3 2 】

これらのNMRデータから、得られた化合物はそれぞれ上述の式(1)~式(6)で表されることが分かった。

## 【 0 0 3 3 】

## 2. 抗リーシュマニア活性測定

## (1) in vitro抗リーシュマニア活性測定

上述した手順により単離した式(1)~(6)で表される化合物について下記に示す条件の下、生理活性測定を行った。リーシュマニア原虫として、Leishmania.major promastigotesを選択し、蛍光蛋白egfp遺伝子を導入したL.major / egfp promastigotesを用いて、上記化合物をサンプルとして下記の条件で成長阻害率を求めた。

40

## 【 0 0 3 4 】

## (測定手順)

25 において96-穴プレートを用いて10%ウシ胎児血清25 mMおよびHepes Buffer (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH)を添加した199培地(日水製薬)中でL.major / egfp promastigotesを培養した。次に、96穴プレートの各ウェルにL.major / egfp 原虫100  $\mu$ L ( $1 \times 10^6$  cell / mL)及びサンプル溶液100  $\mu$ L (DMSOに溶解)を加え、25 で72時間培養を行った。その後、蛍光マイクロプレート読み取り装置(Fluoroscan Ascent FL, 大日本製薬)を用いて励起光485 nm、放射光538 nmでL.major / egfp promastigotesの蛍光シグナルを測定した。また、標準物質としてAmphotericin Bを用いた場合の成長阻害率を100%として、各試料の阻害率を示した。

50

## 【 0 0 3 5 】

図 9 には測定の結果、求められた成長阻害率を示す。これらの結果により、式 ( 1 ) ~ ( 6 ) で表される化合物はリーシュマニア原虫の成長を阻害する生理活性特性を有することが示された。特に、式 ( 3 ) で表される化合物の成長阻害率はAmphotericin Bの成長阻害率と略同等であった。

## 【 0 0 3 6 】

## ( 2 ) in vivo抗リーシュマニア活性測定

上述の手順により単離した式 ( 3 ) で表される化合物についてin vivoにおける抗リーシュマニア活性を評価するためにリーシュマニア症マウスモデルを用いて治療効果を調べた。

10

## 【 0 0 3 7 】

6週令のマウス ( Balb/C, male, 1群6頭 ) にリーシュマニア原虫L.major PM2株  $1 \times 10^7$  の培養promastigotesを感染させた。感染の次の日からマウスに腹腔接種により式 ( 3 ) で表される化合物を各検体に200  $\mu$ gずつ投与した。投与スケジュールは1日1回、3週間連続投与とした。また、コントロールとしてAmphotericin Bの投与を行った治療群、何も投与を行わない治療群についても測定を行った。

## 【 0 0 3 8 】

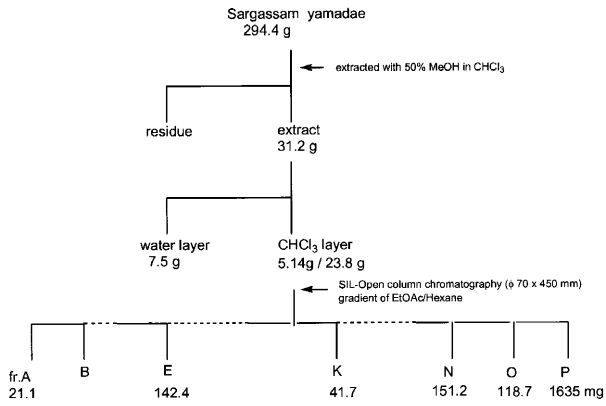
マウスの潰瘍サイズを計測した結果を図 1 0 に示す。また、図 1 1 にはマウスの血中の抗体価の変動を示す。また、図 1 2 にはマウスの血液から抽出したDNAを鋳型として用い、原虫遺伝子を標的として実施したPCRにより増幅したDNA産物を電気泳動した結果を示す。即ち、図 1 2 は、血中における原虫DNAの検出結果を示し、原虫DNAが存在する場合には310bpの位置にPCR産物が観察される。図 1 2 において白色が濃くなるほど原虫DNAが高い濃度で存在することを示している。一方、310bpが黒色の場合には原虫DNAが存在しないことを示している。

20

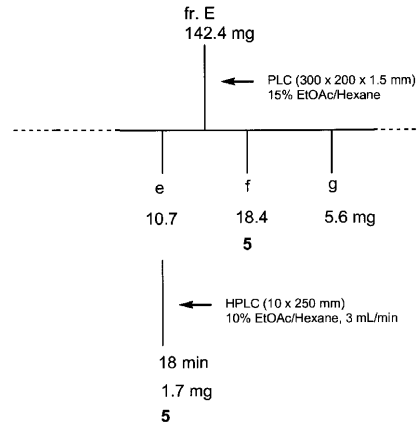
## 【 0 0 3 9 】

これらの結果から式 ( 3 ) で示される化合物はin vivoにおいてもAmphotericin Bと同様の抗リーシュマニア活性を示すことが分かった。

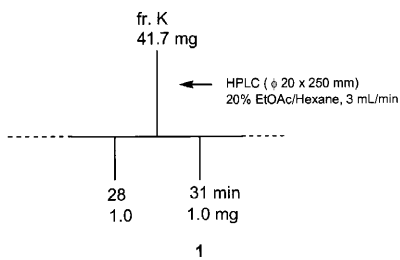
【 図 1 】



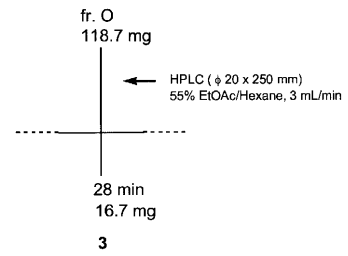
【 図 2 】



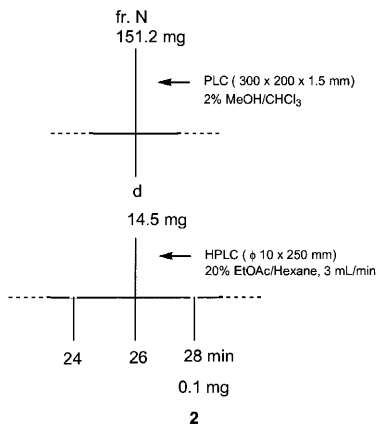
【 図 3 】



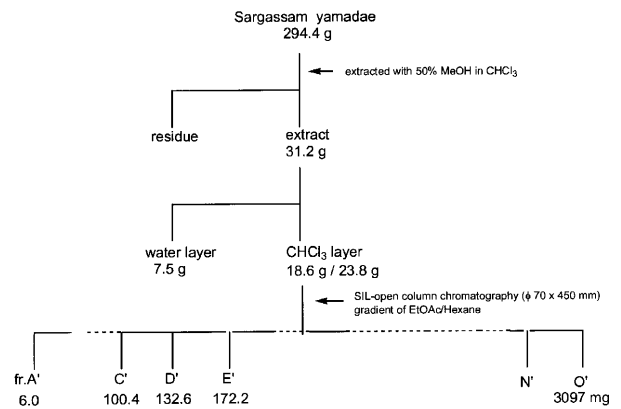
【 図 5 】



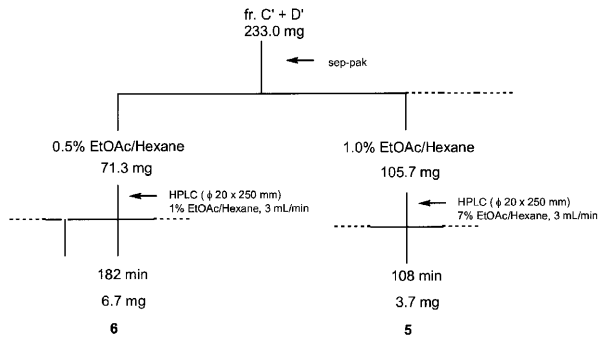
【 図 4 】



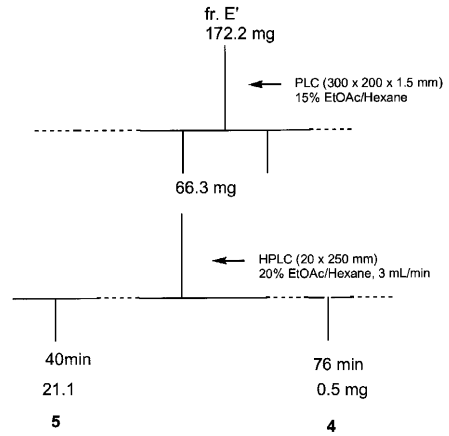
【 図 6 】



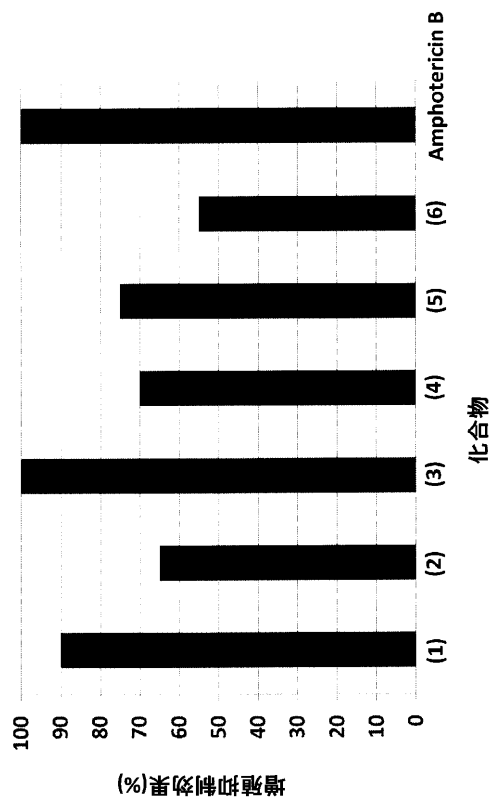
【 図 7 】



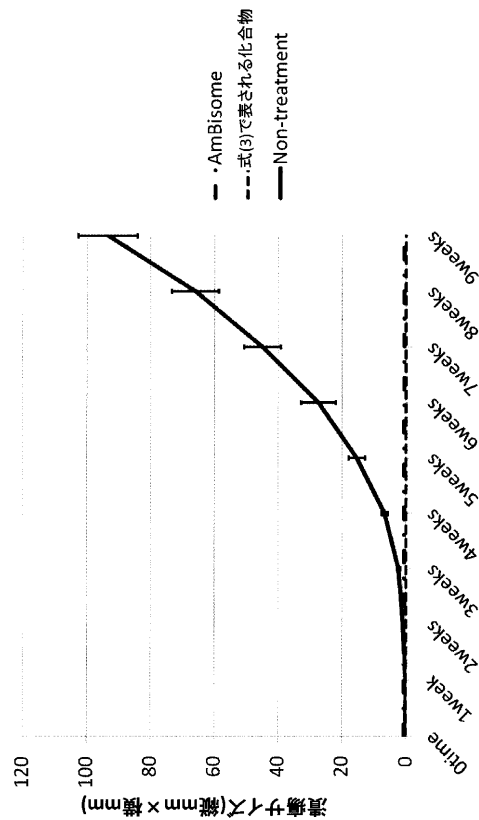
【 図 8 】



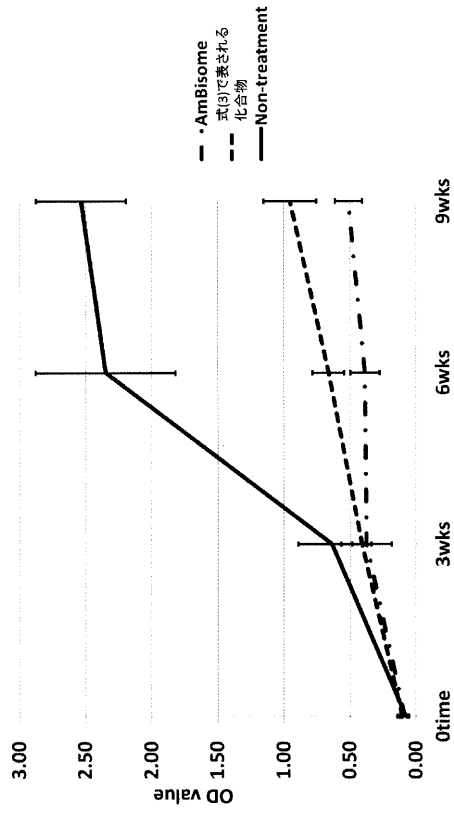
【 図 9 】



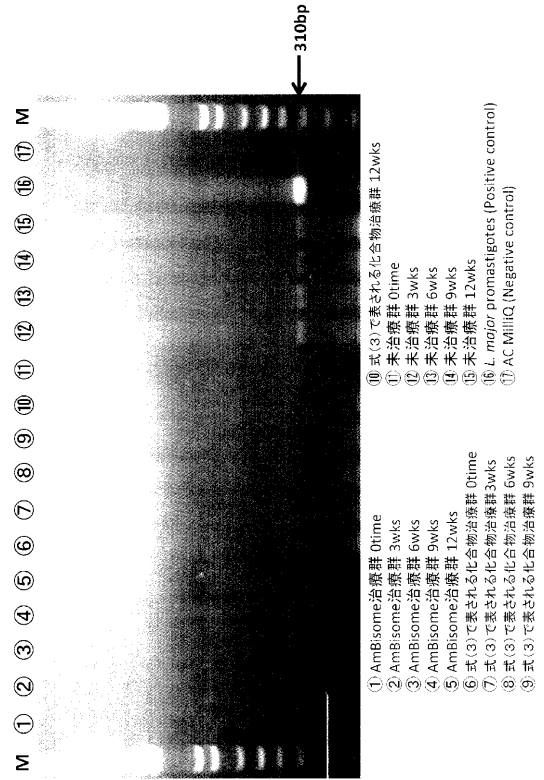
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】





## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/055292

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07C403/02(2006.01)i, A61K31/202(2006.01)i, A61P33/02(2006.01)i, C07C59/82(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07C403/02, A61K31/202, A61P33/02, C07C59/82		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JUNG et al. Meroditerpenoids from the Brown Alga Sargassum siliquastrum, Journal of Natural Products, 2008, 71(10), p.1714-1719	1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 23 March, 2011 (23.03.11)		Date of mailing of the international search report 05 April, 2011 (05.04.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 5 5 2 9 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07C403/02(2006.01)i, A61K31/202(2006.01)i, A61P33/02(2006.01)i, C07C59/82(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07C403/02, A61K31/202, A61P33/02, C07C59/82											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	JUNG et al. Meroditerpenoids from the Brown Alga Sargassum siliquastrum, Journal of Natural Products, 2008, 71(10), p. 1714-1719	1-2									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 23.03.2011		国際調査報告の発送日 05.04.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 近藤 政克	<table border="1"> <tr> <td>4 V</td> <td>9 7 3 4</td> </tr> </table>	4 V	9 7 3 4						
4 V	9 7 3 4										
		電話番号 03-3581-1101	内線 3483								

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), 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, CL, 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, KG, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 松本 芳嗣  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 三條場 千寿  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 長田 康孝  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

Fターム(参考) 4C206 AA01 AA02 DA11 KA01 NA14 ZB38  
4H006 AA01 AA03 AB20 BJ20 BR70 BS10

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。