

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年9月24日(24.09.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/116604 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 15/00 (2006.01) *C12N 1/14* (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01) *C12P 7/02* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) *C12R 1/885* (2006.01)
C07C 35/44 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/055367
- (22) 国際出願日: 2009年3月12日(12.03.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-67498 2008年3月17日(17.03.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大村 智 (OMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒1570076 東京都世田谷区岡本3-3-12 Tokyo (JP). 塩見 和朗 (SHIOMI, Kazuro) [JP/JP]; 〒1500013 東京都渋谷区恵比寿1-23-7-202 Tokyo (JP). 増間 碌郎 (MASUMA, Rokuro) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田4-7-13-102 Tokyo (JP). 宇井 英明 (UI, Hideaki) [JP/JP]; 〒2110016 神奈川県川崎市中原区市ノ坪548-90 Kanagawa (JP). 永井 隆之 (NAGAI, Takayuki) [JP/JP]; 〒1560055 東京都世田谷区船橋6-5-4-40
- 3 Tokyo (JP). 山田 陽城 (YAMADA, Hiroki) [JP/JP]; 〒1770043 東京都練馬区上石神井南町4-26 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 和憲 (KOBAYASHI, Kazunori); 〒1700004 東京都豊島区北大塚2丁目25番1号 太陽生命大塚ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, 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, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))



WO 2009/116604 A1

(54) Title: WICKEROL AND PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: ウイッカロール (wickerol) 及びその製造法

(57) Abstract: Disclosed is wickerol. Also disclosed is a process for producing wickerol, which comprises the steps of: culturing *Trichoderma atroviride* strain FKI-3737 (FERM ABP-11099) (which is a filamentous bacterium) in a culture medium to accumulate wickerol in a culture; and isolating and purifying wickerol from the culture. Further disclosed is an effective inhibitor of the proliferation of an influenza virus, which comprises wickerol as an active ingredient. Still further disclosed is an effective anti-influenza agent which comprises wickerol as an active ingredient.

(57) 要約: 糸状菌に属するトリコデルマ・アトロビリデ (Trichoderma atroviride) F K I - 3 7 3 7 (FERM ABP-11099) 菌株を培地で培養し、培養物中にウイッカロール (wickerol) を蓄積せしめ、該培養物からウイッカロール (wickerol) を単離、精製するウイッカロール (wickerol) 及びその製造法であって、得られたウイッカロール (wickerol) を有効成分とするインフルエンザウイルスの有効な増殖阻害活性物質およびウイッカロール (wickerol) を有効成分とする有効な抗インフルエンザ薬を得るものである。

明 細 書

ウィッカロール (wickerol) 及びその製造法

技術分野

本発明は、インフルエンザウイルスの増殖阻害活性を有するため医薬品、動物薬に有効な新規ウィッカロール (wickerol) 及びその製造法に関する。

背景技術

インフルエンザウイルスは、変異を繰り返しながら毎年のように世界中で流行し、またそれに加えて数十年に一度、数百万～数千万の死者を出す世界規模の大流行が起こっている疾病である。現在、アジアを中心として家禽類に大規模な流行を起こしている高病原性鳥インフルエンザH5N1なども、次の世界的流行を引き起こすウイルスとして危惧されていることは周知の通りである。しかし、現状ではヒトへの被害を食い止める手段は、ワクチンの接種もしくは薬剤の投与となるが、新型ウイルスの大流行にあたっては流行予測が必要なワクチンによる対応が極めて困難であり、また、発症後の治療には利用することができない。

しかしながら、治療薬の存在は不可欠であるが、現在、利用可能な抗インフルエンザ薬は、2つの作用点、すなわちノイラミニダーゼ及びM2イオンチャンネルに対する4種、具体的な薬剤としては、オセルタミビル（スイス国、ロッシュ社）、ザナミビル（英国、グラクソ・スミスクライン社）、アマンタジン（スイス国、ノバルティス社）、リマンタジン（米国、フォレスト社）が挙げられる。

これらの内、日本国における治療薬の認可は3種のみである。しかし、前記いずれの治療薬にも既に耐性種が出現しており、投与方法やウイルス亜型に対するスペクトル、副作用などの問題点もあることから、大流行時の備えとして充分とは言い難い。

こうした中、新たな抗インフルエンザ薬の開発に対する社会的関心は非常に高い。そして、新型や薬剤耐性のウイルス対策としては作用点や構造の異なる薬剤を複数もつことが重要である。しかし、このような作用点や構造の異なる薬剤は未だ提案され

ていないことから、新しい薬剤が熱望されている。

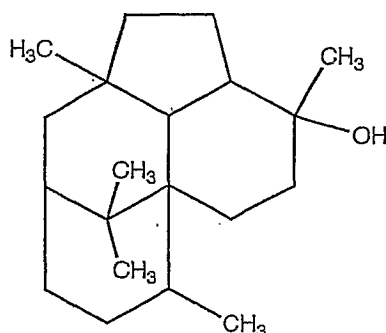
インフルエンザの発症は、インフルエンザウイルスが爆発的に増殖して炎症、発熱などを引き起こすことによる。インフルエンザウイルスは、次々と新しい細胞に感染しては増殖を繰り返すことから、その細胞への接着から発芽・成熟までのいずれかの生活環を阻害することができれば、爆発的なウイルスの増殖を阻害することができ、ひいてはインフルエンザの発症を抑える若しくは症状を緩和することができるインフルエンザウイルスの増殖阻害活性物質および抗インフルエンザ薬として大いに期待される。

本発明は、このような事情に鑑みて研究開発されたものであり、インフルエンザウイルスの増殖阻害活性物質および抗インフルエンザ薬としての期待を満足し得るものである。すなわち、本発明によるトリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) F K I - 3 7 3 7 (FERM ABP-11099) 菌株を用いて培養し、培養物から単離、精製した物質ウイッカロール (wickerol) を得、該ウイッカロールを有効成分とするインフルエンザウイルスの増殖阻害活性物質およびウイッカロール (wickerol) を有効成分とする抗インフルエンザ薬として提供することを目的とするものである。

発明の開示

本発明者らは、微生物の培養物中からインフルエンザウイルスが細胞への感染を介して増殖する過程を阻害する物質の探索を続けた結果、本発明者らが土壌より採取した糸状菌 F K I - 3 7 3 7 株の生産する新規ウイッカロール (wickerol) が細胞への感染を介して増殖する過程を阻害する活性を有することを見出した。本発明はこのような知見に基づいて完成するに至ったものである。

本発明に係る知見に基づいて完成されたものであって、請求の範囲 1 記載の下記式



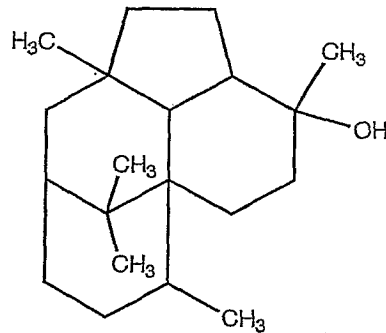
で表されるウイッカロール (wickerol) を提供するものである。

本発明は、請求の範囲 2 記載の糸状菌に属し請求の範囲 1 に記載のウイッカロール (wickerol) を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養物中にウイッカロール (wickerol) を蓄積せしめ、該培養物からウイッカロール (wickerol) を採取することを特徴とするウイッカロール (wickerol) の製造法を提供するものである。

本発明は、請求の範囲 2 に記載のウイッカロール (wickerol) を生産する能力を有する微生物が、トリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) F K I - 3 7 3 7 (FERM ABP-11099) である製造法を提供するものである。

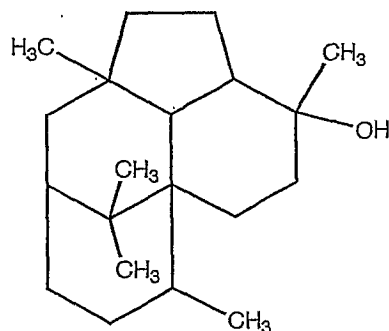
本発明は、請求の範囲 4 に記載のトリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) F K I - 3 7 3 7 (FERM ABP-11099) 株を提供するものである。

本発明は、請求の範囲 5 に記載の下記式



で表されるウイッカロール (wickerol) を有効成分とするインフルエンザウイルスの増殖阻害活性物質を提供するものである。

本発明は、請求の範囲 6 に記載の下記式



で表されるウイッカロール (wickerol) を有効成分とする抗インフルエンザ薬を提供するものである。

本発明のウィッカロール (wickerol) を生産する能力を有する微生物 (以下時として「FKI-3737物質生産菌」と称する場合もある) は、トリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) 属に属するが、例えば本発明者らが新たに土壤から分離したトリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) FKI-3737株は、本発明において最も有効に使用される菌株の一例である。本発明のトリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) FKI-3737株の菌学的性状を示すと以下のとおりである。

1. 形態的特徴

本菌株は、ポテト・デキストロース寒天培地、コーンミール・デキストロース寒天培地、麦芽汁寒天培地などで良好に生育し、各種寒天培地で分生子の着生は良好であった。ポテト・デキストロース寒天培地に生育したコロニーを顕微鏡で観察すると、菌糸は透明で隔壁を有している。分生子柄は基底菌糸より直生し、分生子柄の先端にフィアライドを生じる。フィアライドの大きさは7.5-12.5 x 2.0-2.8 μm で、3~5本輪生して生じ、ずんぐりして短い。フィアライドの先端から分生子が生じ、粘性球形を形成する。分生子は球形~亜球形で大きさは2.3-2.8 x 2.3-3.0 μm で、その表面は滑面である。

2. 各種寒天培地上での性状

本菌株を各種寒天培地上で、25℃、3日間培養した場合の肉眼的観察結果を下記の第1表に示す。

第1表

培地	培地上の生育状態 (コロニーの半径)	コロニー表面 の色調	コロニー裏面 の色調	可溶性 色素
ポテト・デキストロース寒天培地	良好 (65-69 mm)			
	羊毛状	白色	白色	なし
	周辺菌糸状			

コーン・ミール・デキストロース寒天培地

良好 (34-37 mm)

羊毛状 無色～白色 無色～白色 なし

周辺菌糸状

麦芽汁寒天培地

良好 (65-67 mm)

羊毛状 白色 白色 なし

周辺菌糸状

合成ニュートリエント寒天培地

良好 (53-55 mm)

羊毛状 無色 無色 なし

周辺菌糸状

3. 生理的性質

(1) 最適生育条件

本菌株の最適生育条件は、pH 3～6、温度 16.0～30.0℃である。

(2) 生育の範囲

本菌株の生育範囲は、pH 2～8、温度 10.0～32.0℃である。

(3) 好気性、嫌気性の区別

好気性。

上記の F K I - 3 7 3 7 株は、その形態的特徴、培養性状および生理的性状に基づき、既知菌種との比較を試みた結果、本菌株はトリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) に属する一菌株と同定し、トリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) F K I - 3 7 3 7 と命名した。本菌株はトリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) F K I - 3 7 3 7 として、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) [AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japan] の独立行政法人産

業技術総合研究所 特許生物寄託センター [International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology] に北里大学北里生命科学研究所 微生物資源センターによって2008年3月6日に寄託された。受託番号はFERM P-21520が付与された。その後、本菌株は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき、上述の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに平成21年(09)2月23日に国際寄託へ移管請求され、移管申請の受理がなされた。受領番号はFERM ABP-11099が付与された。

本発明で使用されるFKI-3737物質生産菌は、前述のトリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) FKI-3737株が最も好ましい例として挙げられるが、菌の一般的性状として菌学上の性状は極めて変異しやすく、一定したものではなく、自然的にあるいは通常行われる紫外線照射、X線照射、遺伝子操作株、自然変異株も含め、糸状菌に属し、本発明による物質ウイッカロール (wickerol) を生産する能力を有する菌株はすべて本発明に使用することができる。

本発明のウイッカロール (wickerol) を製造するにあたっては、先ず糸状菌に属するウイッカロール (wickerol) を生産する能力を有する微生物を培養し、その培養物から分離・精製すればよい。本発明に用いることのできる菌株は上記の菌株、その変異株をはじめ、糸状菌に属するFKI-3737物質生産菌のすべてが使用できる。

FKI-3737物質生産菌に適した栄養源としては、糸状菌の栄養源として使用し得るのものであればよい。例えば、市販のペプトン、肉エキス、コーン・ステープ・リカー、綿実粉、落花生粉、大豆粉、酵母エキス、NZ-アミン、カゼインの水和物、硝酸ソーダ、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウムなどの窒素源、グリセリン、澱粉、グルコース、ガラクトース、マンノースなどの炭水化物、あるいは脂肪などの炭素源、および食塩、リン酸塩、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウムなどの無機塩を単独あるいは組み合わせて使用できる。

その他必要に応じて微量の金属塩、消泡剤として動・植・鉱物油などを添加するこ

ともできる。これらのものは、生産菌が利用し、ウィッカロール (wickerol) の生産に役立つものであればよく、公知の糸状菌の培養材料はすべて用いることができる。また、ウィッカロール (wickerol) の培養温度は、生産菌が発育し、ウィッカロール (wickerol) を生産できる範囲で適用できる。培養は、以上に述べた条件を使用する F K I - 3 7 3 7 物質生産菌の性質に応じて適宜選択して行うことができる。

ウィッカロール (wickerol) は、培養液よりクロロホルム、酢酸エチルなどの水不混和性の有機溶媒で抽出することができる。上記の抽出法に加え、脂溶性物質の採取に用いられる公知の方法、例えば吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーよりのかき取り、遠心向流分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を適宜組み合わせ或いは繰り返すことによって純粋に採取することができる。

本発明によるウィッカロール (wickerol) の理化学的性状は次の通りである。

- (1) 性状 : 白色粉末
- (2) 分子量 : 290.2605 (M^+ 、高分解能電子イオン化質量分析による)
- (3) 分子式 : $C_{20}H_{34}O$
- (4) 比旋光度 : $[\alpha]^{25} = -2.8^\circ$ ($c=0.1$ 、メタノール)
- (5) 紫外部吸収極大 (メタノール中) : 末端吸収のみ観測された
- (6) 赤外部吸収極大 (KBr錠) : 3319、2954、2929、2875、2360、1734 cm^{-1} に極大吸収を有する
- (7) プロトン核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中の化学シフト (ppm) 及びスピン結合定数 (Hz) を第2表に示す
- (8) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中の化学シフト (ppm) を第2表に示す
- (9) 溶剤に対する溶解性 : ノルマルヘキサン、クロロホルム、アセトン、エタノールに易溶。メタノール、2-プロパノールに可溶。水に難溶
- (10) 呈色反応 : リンモリブデン硫酸に陽性。

第 2 表

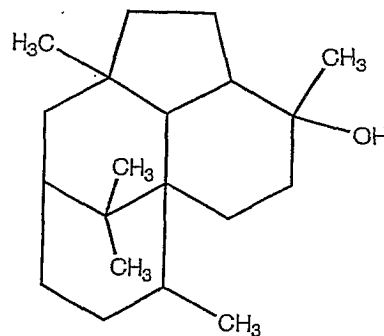
$^{13}\text{C} - \text{NMR}$	$^1\text{H} - \text{NMR}$
73.9 s	
52.0 d	1.27 d (1H, J=13.4)
44.4 d	1.87 ddd (1H, J=6.1, 10.0, 13.4)
43.9 t	1.41 brd (1H, J=11.2)
	1.00 brd (1H, J=11.2)
43.0 t	1.68 dd (1H, J=4.2, 12.3)
	1.49 m (1H)
41.1 d	1.48 m (1H)
40.8 t	1.58 ddd (1H, J=3.5, 3.6, 12.8)
	1.44 m (1H)
39.2 s	
38.8 s	
38.7 s	
28.8 t	2.00 dddd (1H, J=2.6, 11.2, 11.2, 15.5)
	1.46 m (1H)
26.6 d	2.11 m (1H)
26.4 t	1.69 m (1H)
	1.21 ddd (1H, J=3.5, 14.2, 14.2)
25.7 t	2.09 m (1H)
	1.62 m (1H)
25.6 q	0.94 s (3H)
24.6 q	1.05 s (3H)
22.9 d	1.02 d (3H, J=7.0)
21.6 t	1.79 m (1H)
	1.58 m (1H)
20.5 d	1.17 s (3H)

19.9 d

1.05 s (3H)

注：sはシングレット、dはダブルット、ddはダブルダブルット、dddはダブルダブルダブルット、ddddはダブルダブルダブルダブルット、tはトリプレット、qはカルテット、mはマルチプレット、brdはブロードダブルット、Hはプロトンの数、Jはスピン結合定数 (Hz) を示す。

本発明のウイッカロール (wickerol) の各種理化学的性状やスペクトルデータを検討した結果、ウイッカロールは下記の式で表される構造であることが決定された。



以上のとおり、ウイッカロール (wickerol) の各種理化学的性状について詳述したが、このような性質に一致する化合物はこれまでに報告されておらず、ウイッカロール (wickerol) は新規物質であると決定した。

次に、本発明のウイッカロール (wickerol) の細胞への感染を介したインフルエンザウイルスの増殖を阻害する活性について以下に説明する。

インフルエンザウイルスの細胞への感染を介した増殖の検定は、以下のようにして行った。48穴マイクロプレート (米国、ベクトン・ディッキンソン社) に1穴あたり500 μ l の細胞培養用培地 [MEM (米国、ギブコ社61100-053) 9.5 g/l、ウシ胎児血清 (米国、ハイクローン社) 10 %] に、50,000個づつ懸濁させたイヌ腎臓由来MDCK細胞を蒔いた。そのプレートを37°C、5% 二酸化炭素の条件下で2日間培養した。

次に、培地を除き、500 μ l のリン酸緩衝液 (PBS ; 塩化ナトリウム137 mM、リン酸水素二ナトリウム8.1 mM、塩化カリウム2.68 mM、リン酸二水素カリウム1.47 mM) で2回洗浄後、1穴あたり500 μ l の感染用培地 [イーグルMEM 培地 (日本国、ニッ

スイ社 05901) 9.4 g/l、ブドウ糖0.1%、アセチルトリプシン 3 $\mu\text{g/ml}$ 、L-グルタミン0.3 mg/ml、ビタミン溶液 (米国、ギブコ社11120-052) 1 ml/l、葉酸 1 $\mu\text{g/ml}$ 、ビオチン 1 $\mu\text{g/ml}$ 、HEPES 3 mg/ml、アムホテリシンB 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、ゲンタミシン 200 $\mu\text{g/ml}$ 、炭酸水素ナトリウム2.25 mg/ml、ウシ血清アルブミン 2 mg/ml を添加したものを]に懸濁させたインフルエンザウイルスを添加した。

ここにサンプルを溶媒に溶解させて直径 6 mmのパラフィン紙にしみ込ませた後に乾燥させたものを添加し、そのプレートをシェーカー (日本国、タイテック社、WAVE-PR) 上で緩やかに攪拌しながら37°C、5% 二酸化炭素の条件下で更に3日間培養した。培養終了後、培地を除去してから500 μl のPBS で2回洗浄後、72.5 μl の25% グルタルアルデヒドを添加して、室温で10分間細胞を固定した。上清を除去して500 μl のPBS で2回洗浄し、125 μl の0.05% クリスタルバイオレット液を添加して、室温で15分間発色反応を行った。

上清を除去後、500 μl のPBS で4回洗浄し、500 μl の0.5% SDS 溶液を添加し、攪拌して溶解後、各溶解液を100 μl ずつ96穴プレートにとり、100 μl のPBSを添加し、マイクロプレートリーダー (米国、バイオテックインスツルメンツ社、ELx808) にて595 nmの紫外吸収を測定することにより細胞生存率を検定した。ウィッカロール (wickerol) の細胞への感染を介したインフルエンザウイルスの増殖を阻害する活性は、サンプル添加時に溶媒のみをしみ込ませて乾燥させたパラフィン紙を添加して同様に処理したものをコントロールとして比較し、算出した。

その結果、ウィッカロール (wickerol) は、インフルエンザウイルスA/PR/8/34 のMDCK細胞への感染を介した増殖を $\text{IC}_{50} = 70 \text{ ng/ml}$ で阻害した。一方、MDCK細胞単独での増殖に対しては、 $\text{IC}_{50} = 7 \mu\text{g/ml}$ で阻害活性を示した。したがって、ウィッカロール (wickerol) は細胞毒性よりも約100倍強いインフルエンザウイルス増殖阻害活性を示した。

本発明のウィッカロール (wickerol) の抗菌活性は以下のとおりである。

濾紙円板 (アドバンテック社、直径 6 mm) にウィッカロール (wickerol) の 1 mg/ml のメタノール溶液をそれぞれ10 μl 浸漬し、一定時間、風乾して溶媒を除去後、下記の試験菌含菌寒天平板に張り付け、35°C で24時間培養後、濾紙円板の周りにできた

生育阻止円の直径を測定し、その結果を第3表に示した。

第3表

試験菌	阻止円径 (mm)
スタフィロコッカス・アウルス (<u>Staphylococcus aureus</u>) ATCC6538p	—
バチルス・サブチリス (<u>Bacillus subtilis</u>) ATCC6633	—
ミクロコッカス・ルテウス (<u>Micrococcus luteus</u>) ATCC9341	±
ミコバクテリウム・スメグマチス (<u>Mycobacterium smegmatis</u>) ATCC607	—
エシエリヒア・コリ (<u>Escherichia coli</u>) NIHJ	—
エシエリヒア・コリ (<u>Escherichia coli</u>) NIHJ JC-2 (IF012734)	—
シュードモナス・エルギノーザ (<u>Pseudomonas aeruginosa</u>) IF03080	—
キサントモナス・カンペストリス pv. オリゼ (<u>Xanthomonas campestris</u> pv. <u>oryzae</u>) KB88	—
バクテロイデス・フラジリス (<u>Bacteroides fragilis</u>) ATCC23745	—
アコレプラズマ・レイドロウイ (<u>Acholeplasma laidrawii</u>) KB174	—
カンジダ・アルビカンス (<u>Candida albicans</u>) KF1	—
サッカロミセス・セレヴィジアエ (<u>Saccharomyces cerevisiae</u>) KF26	—
ピリキュラリア・オリゼ (<u>Pyricularia oryzae</u>) KF180	±
アスペルギルス・ニガー (<u>Aspergillus niger</u>) ATCC6275	—
ムコール・ラセモサス (<u>Mucor racemosus</u>) IF04581	—

本発明のウィッカロール (wickerol) は、第3表の微生物に対してほとんど抗菌活性を示さなかった。したがって、本発明のウィッカロール (wickerol) は細胞への感染を介したインフルエンザの増殖を阻害する物質あるいは抗インフルエンザ薬などの薬剤として使用し得る。

発明の効果

以上説明したように、本発明による新規なウィッカロール (wickerol) ならびに糸状菌 F K I - 3 7 3 7 株からの物質および該物質の製造法が微生物法によって得られ、そして、得られた物質はインフルエンザウイルスの増殖阻害活性物質、インフルエ

ンザ薬などの薬剤として有効に使用し得る。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

寒天斜面培地で培養したトリコデルマ・アトロピリデ (*Trichoderma atroviride*) F K I - 3 7 3 7 (FERM ABP-11099) より、グルコース2.0 %、ポリペプトン (日本国、日本製薬社) 0.5 %、酵母エキス (日本国、オリエンタル酵母工業社) 0.2 %、寒天0.1 %、リン酸二水素カリウム0.1 %、硫酸マグネシウム七水和物0.05%からなる液体培地 (pH 6.0) が、100 ml 入った500 ml 容三角フラスコに1白金耳接種し、27°Cで2日間振盪培養した。

得られた種培養液を可溶性デンプン3.0 %、グリセロール1.0 %、大豆粉2.0 %、乾燥酵母 [Fermipan、GBイングレディエント社、オランダ国] 0.3 %、炭酸カルシウム0.2 %、リン酸二水素カリウム 0.05 %、硫酸マグネシウム七水和物 0.05 %からなる液体培地 (pH 6.5) が、100 ml 入った500 ml 容三角フラスコ90本に各1 ml ずつ植菌し、27°Cで4日間振盪培養した。

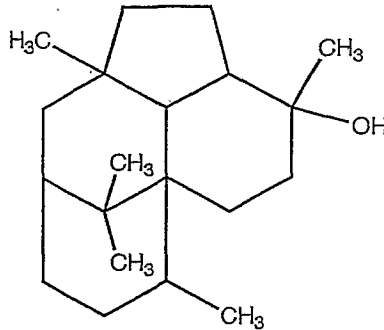
培養の終了した500 ml 容三角フラスコ90本にそれぞれ100 ml のエタノールを加えて1時間激しく攪拌した。次に、その抽出液中のエタノールを減圧留去し、得られた水溶液のpHを水酸化ナトリウムで9に調整した後、等量のノルマルヘキサンで抽出し、濃縮乾固して1.38 gの粗物質を得た。このうち、0.70 gをノルマルヘキサンで充填したシリカゲルカラム ($\phi 2.2 \times 15.0 \text{ cm}$) にのせ、ノルマルヘキサン-アセトン (100 : 5) で溶出し、目的とする活性の見られた画分を回収し、減圧濃縮により25.3mgのウィッカロール (wickerol) を白色粉末として得た。

産業上の利用可能性

本発明は、糸状菌に属しウィッカロール (wickerol) を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養物中にウィッカロール (wickerol) を蓄積せしめ、該培養物からウィッカロール (wickerol) を採取することを特徴とするウィッカロールおよびその製造法である。得られたウィッカロールはインフルエンザウイルスの増殖阻害活性物質、およびインフルエンザ薬などの薬剤として有効に使用し得る。

請求の範囲

1. 下記式



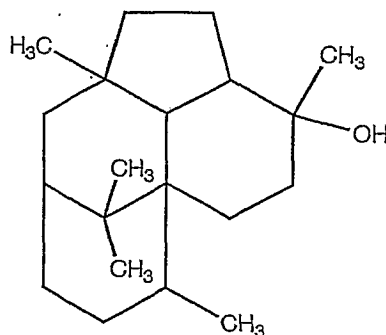
で表されるウイッカロール (wickerol)。

2. 糸状菌に属し、請求項1記載のウイッカロール (wickerol) を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養物中にウイッカロール (wickerol) を蓄積せしめ該培養物からウイッカロール (wickerol) を採取することを特徴とするウイッカロール (wickerol) の製造法。

3. ウイッカロール (wickerol) を生産する能力を有する微生物が、トリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) F K I - 3 7 3 7 (FERM ABP-11099) である請求項2記載の製造法。

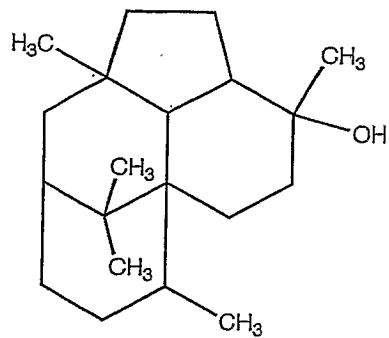
4. トリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*) F K I - 3 7 3 7 (FERM ABP-11099) 株。

5. 下記式



で表されるウィッカロール (wickerol) を有効成分とするインフルエンザウイルスの増殖阻害活性物質。

6. 下記式



で表されるウィッカロール (wickerol) を有効成分とする抗インフルエンザ薬。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P15/00(2006.01)i, A61K31/045(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, C07C35/44(2006.01)i, C12N1/14(2006.01)i, C12P7/02(2006.01)i, C12R1/885(2006.01)n

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)

C12P15/00, A61K31/045, A61P31/16, C07C35/44, C12N1/14, C12P7/02, C12R1/885

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hideaki UI et al., "Shijokin no Seisan suru Shinki Ko-Influenza Virus Busshitsu no Tanri, Kozo Oyobi Kassei", Abstracts of 128th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan 2, 05 March, 2008 (05.03.08), page 126	1-6
A	JP 4-94693 A (Nippon Mektron, Ltd.), 26 March, 1992 (26.03.92), Page 587, left column & US 5202244 A1 & DE 4126325 A1	1-6
A	JP 49-20389 A (Imperial Chemical Industries Ltd.), 22 February, 1974 (22.02.74), Claims (Family: none)	1-6



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
15 May, 2009 (15.05.09)

Date of mailing of the international search report
26 May, 2009 (26.05.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055367

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUKAMI A. et al., A new anti-influenza virus antibiotic, 10-norparvulenone from <i>Microsphaeropsis</i> sp. FO-5050, <i>J. Antibiot.</i> , 2000.10, Vol.53, No.10, pp.1215-1218	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12P15/00(2006.01)i, A61K31/045(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, C07C35/44(2006.01)i, C12N1/14(2006.01)i, C12P7/02(2006.01)i, C12R1/885(2006.01)n

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. C12P15/00, A61K31/045, A61P31/16, C07C35/44, C12N1/14, C12P7/02, C12R1/885

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
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2009年
 日本国実用新案登録公報 1996-2009年
 日本国登録実用新案公報 1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), 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	宇井英明 他, 糸状菌の生産する新規抗インフルエンザウイルス物質の単離、構造および活性, 日本薬学会第128年会要旨集2, 2008.03.05, p.126	1-6
A	JP 4-94693 A (日本メクトロン株式会社) 1992.03.26, 第587頁左欄 & US 5202244 A1 & DE 4126325 A1	1-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。 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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 15.05.2009	国際調査報告の発送日 26.05.2009
--------------------------	--------------------------

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) 小金井 悟	4 B	3 9 6 1
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 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	JP 49-20389 A (インペリアル ケミカル インダストリーズ リミ テッド) 1974.02.22, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
A	FUKAMI A. et al., A new anti-influenza virus antibiotic, 10-norparvulenone from Microsphaeropsis sp. FO-5050, J. Antibiot., 2000.10, Vol.53, No.10, pp.1215-1218	1-6