

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-6917

(P2012-6917A)

(43) 公開日 平成24年1月12日(2012.1.12)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
<b>C07K</b>	<b>7/64</b>	<b>(2006.01)</b>	C07K	7/64	ZNA	4B064
<b>C12P</b>	<b>21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C12P	21/02	A	4B065
<b>C12N</b>	<b>1/20</b>	<b>(2006.01)</b>	C12N	1/20	A	4C084
<b>A61K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K	37/02		4H045
<b>A61P</b>	<b>31/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P	31/04		

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2011-116485 (P2011-116485)  
 (22) 出願日 平成23年5月25日 (2011.5.25)  
 (31) 優先権主張番号 特願2010-119138 (P2010-119138)  
 (32) 優先日 平成22年5月25日 (2010.5.25)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(出願人による申告)平成21年度、独立行政法人医薬基盤研究所、基礎研究推進事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 501481492  
 株式会社ゲノム創薬研究所  
 東京都文京区本郷1-27-8-1207  
 (71) 出願人 504137912  
 国立大学法人 東京大学  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号  
 (74) 代理人 100125748  
 弁理士 高橋 徳明  
 (72) 発明者 関水 和久  
 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 浜本 洋  
 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

最終頁に続く

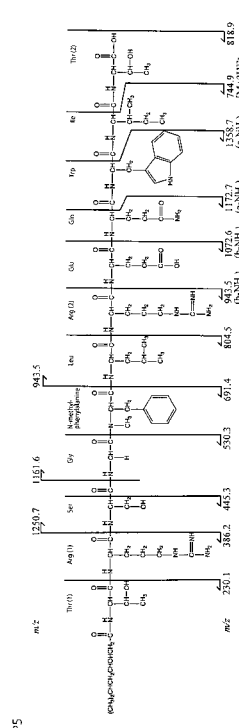
(54) 【発明の名称】新規環状ペプチド化合物とその製造方法及び感染症治療薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】従来の薬剤とは異なる化学構造を有する新規な化合物であり、多剤耐性菌にも有効な新規な化合物となり更に、多くの候補化合物から目的の化合物を選別する際に抗菌活性だけでなく、治療効果も含めて評価して選別することで、実用化へのハードルの低いことが期待できる、治療効果の高い新規な化合物を提供する。

【解決手段】リソバクター(Lysobacter)が産生する新規な環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

【選択図】図4

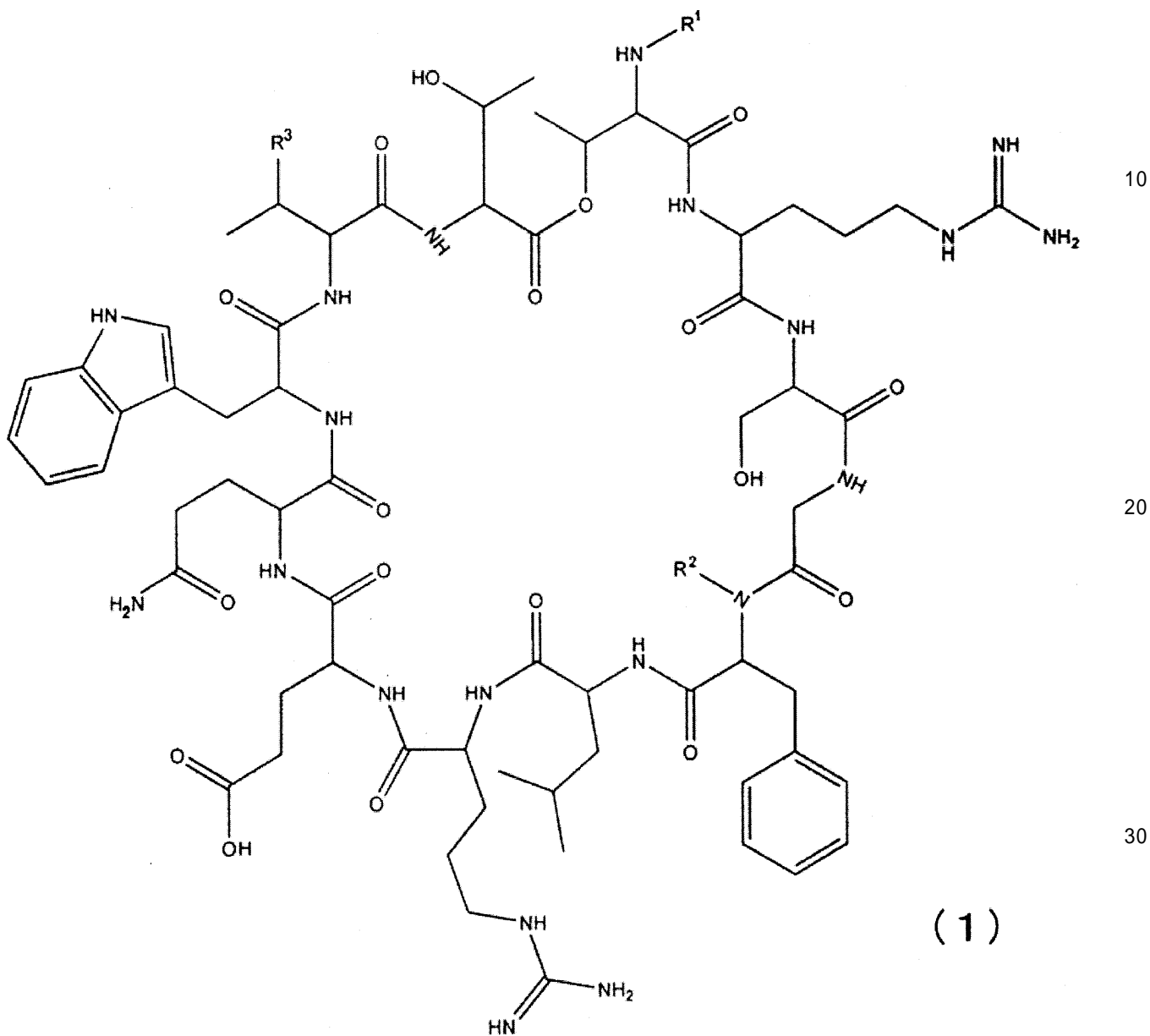


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式(1)で示される環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

## 【化 1】



[式(1)中、 $R^1$ は置換基を有していてもよい炭素数が7、8又は9のアシル基を示し、 $R^2$ はメチル基又は水素原子を示し、 $R^3$ はエチル基又はメチル基を示す。]

## 【請求項 2】

上記式(1)中の $R^1$ の置換基が水酸基である請求項1に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

## 【請求項 3】

上記式(1)中の $R^1$ が、3-ヒドロキシ-5-メチル-ヘキサノイル基、3-ヒドロキシ-6-メチル-ヘプタノイル基又は3-ヒドロキシ-7-メチル-オクタノイル基である請求項1に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

## 【請求項 4】

上記式(1)中の $R^1$ が3-ヒドロキシ-5-メチル-ヘキサノイル基であり、 $R^2$ がメチル基であり、 $R^3$ がエチル基である請求項1に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

## 【請求項 5】

10

20

30

40

50

上記式(1)中のR<sup>1</sup>が3-ヒドロキシ-7-メチル-オクタノイル基であり、R<sup>2</sup>がメチル基であり、R<sup>3</sup>がエチル基である請求項1に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

【請求項6】

独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)の特許微生物寄託センター(NPMD)における受託番号がNITE P-870のリソバクター(Lysobacter)属に属するRH2180-5株、又はその株と同様の化合物を産生する能力を有する変異株を培養し、その培養物から得られる請求項1ないし請求項5の何れかの請求項に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

【請求項7】

請求項1ないし請求項6の何れかの請求項に記載の環状ペプチド化合物を産生する能力を有する、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)の特許微生物寄託センター(NPMD)における受託番号がNITE P-870のリソバクター(Lysobacter)属に属するRH2180-5株、又はその株と同様の化合物を産生する能力を有する変異株を培養し、その培養物から製造することを特徴とする請求項1ないし請求項6の何れかの請求項に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩の製造方法。

【請求項8】

請求項1ないし請求項6の何れかの請求項に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩を、製薬学的に許容し得る担体と共に含んでなる感染症治療薬。

【請求項9】

リソバクター(Lysobacter)属に属する微生物であって、請求項1ないし請求項6の何れかの請求項に記載の環状ペプチド化合物を産生する能力を有する独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)の特許微生物寄託センター(NPMD)における受託番号がNITE P-870であるRH2180-5株、又はその株と同様の化合物を産生する能力を有する変異株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な化学構造を有する化合物とその製造方法、及びその化合物を含有する感染症治療薬とその化合物を産生する新規微生物に関する。

【背景技術】

【0002】

抗生物質は、感染症の治療に必要不可欠なものとなっている。しかしながら、抗生物質の過度の使用はそれに対する耐性菌を生み、その結果多くの薬剤に耐性を有する多剤耐性菌が出現し臨床上大きな問題となっている。特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(以下、「MRSA」と略記する)は、臨床現場での出現頻度が高く、社会的な問題に発展している。更に、MRSAに対する最終的な治療薬として用いられることの多いバンコマイシンに対して耐性を有する腸球菌(バンコマイシン耐性腸球菌、以下、「VRE」と略記する)も、本邦の臨床現場から分離されるようになり、多剤耐性菌に対する新たな治療薬の提供が切望されている。

【0003】

そのような新たな治療薬として完全化学合成による合成抗生物質であるリネゾリドが知られている。また、各種の微生物の産生する抗生物質の中から、上記の多剤耐性菌に有効性を示す抗生物質を見出すための検討も多数行われている(特許文献1~3)。これらのうち、特許文献1と2には、上記の多剤耐性菌に有効性を示す抗生物質を産生するリソバクター属に属する微生物とその微生物を用いた抗生物質の製造方法が記載されている。

【0004】

一方、本発明者は、抗生物質の探索に有用に用いられる、カイコ(カイコガの幼虫)を実験動物とする「カイコ黄色ブドウ球菌感染モデル」(特許文献4)を構築し、その検討

10

20

30

40

50

を進めていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第3339235号公報

【特許文献2】特許第4054576号公報

【特許文献3】特許第4057426号公報

【特許文献4】特開2007-327964号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0006】

上記特許文献2と3には、M R S AだけでなくV R Eに対しても有効性を示す抗生物質が記載されている。しかしながら、従来の報告例の多くは、特許文献1のようにM R S Aに対する有効性だけが記載されており、V R Eに対する有効性を示す抗生物質はほとんど報告されていないのが現状である。そこで耐性菌の出現の可能性を考慮すると、M R S AだけでなくV R Eにも有効性を示し、特許文献2、特許文献3等の既存の抗生物質とは異なる化学構造を有し、耐性菌に対する作用機序も既存の治療薬と異なることが期待できる抗生物質の選択肢を更に増やす必要がある。

【0007】

また、従来の報告例のほとんどは、最小発育阻止濃度（以下、「M I C」と略記することがある）で評価したインピトロにおける抗菌活性を中心に抗生物質が選択されており、インピボにおける治療効果を含めた評価によって抗生物質が選択された例はほとんどなく、最後に治療効果の篩が残っているため、実用化へのハードルが高いという問題がある。

20

【0008】

以上より、本発明の課題は、従来の薬剤とは異なる化学構造を有する新規な化合物を提供することであり、更には、多剤耐性菌にも有効な新規な化合物を提供することにある。

【0009】

また、多くの候補化合物から目的の化合物を選別する際に、抗菌活性だけでなく、治療効果も含めて評価して選別することで、既に実用化へのハードルが低くなっている「治療効果の高い新規な化合物」を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、土壌等の多くの試料から分離した多種の微生物が産生する有用性の高い抗生物質を選別するために、培養上清中の抗生物質を分離・精製する方法として、まず、得られた各分画の抗菌活性を、黄色ブドウ球菌に対するM I C値で評価し、次いで、抗菌活性の認められた試料に対して、先に記載した特許文献4のカイコを実験動物として用いた「カイコ黄色ブドウ球菌感染モデル」を用いて、各分画の治療効果も併せて評価する方法を採用した。

【0011】

その結果、国内各地で採取した土壌中から分離した土壌細菌14,346株のうち、その培養上清にM I Cによる判定で黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を認めた菌株が3,487株あり、それらの菌の培養上清について、「カイコ黄色ブドウ球菌感染モデル」における治療効果を検討したところ、治療効果を示した微生物は45株に減少した。このことから、従来のM I Cで抗菌活性のみを評価した場合は、それによって「治療効果」まで評価されたものではないことが確認された。

40

【0012】

そして、この45株の培養上清の抗菌スペクトルを詳細に検討したところ、新規な化合物を産生する新規な微生物が含まれていることを確認した。更に、45株中にM R S AとV R Eの両者に抗菌活性を示す化合物を産生する微生物が含まれていることを確認した。更に、その微生物の培養上清から得られた抗生物質中に、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデ

50

ルだけでなくマウス黄色ブドウ球菌感染モデルに対しても、既存薬のバンコマイシンと比較して高い治療効果を示す新規な化合物が含まれていることを見出した。

【0013】

また、上記「マウス黄色ブドウ球菌感染モデル」において高い治療効果を示した抗生物質についてその化学構造を含めて詳細に検討したところ、その抗生物質は新規な化学構造を有する環状ペプチド化合物であることを確認した。また、培養上清中には、かかる物質以外にも同様の化学構造を有する関連の環状ペプチド化合物が含まれていること、それらも、かかる物質同様の抗菌スペクトルを示すことを確認した。

【0014】

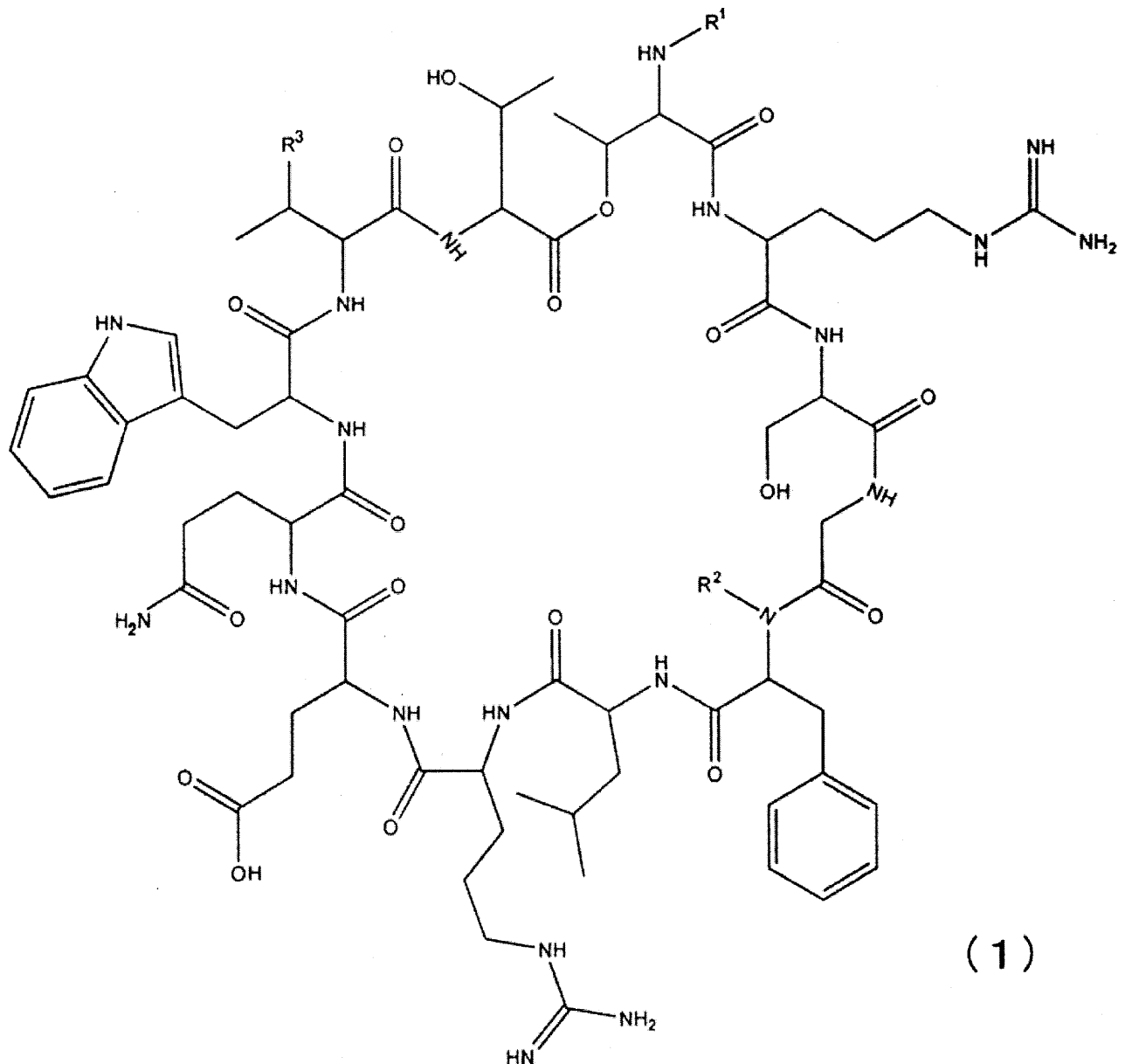
更に、以上の新規抗生物質を産生する微生物は、その性状の分析や16S rRNAの塩基配列等の解析結果、新規な化学構造を有する環状ペプチド化合物を産生していること等から、リソバクター(Lysobacter)属に属する新規微生物(以下、「RH2180-5」と表記する)であることも判明し、本発明を完成するに至った。

【0015】

すなわち、本発明は、以下を提供するものである。

<1> 下記式(1)で示される環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

【化1】



【式(1)中、R<sup>1</sup>は置換基を有していてもよい炭素数が7、8又は9のアシル基を示し

10

20

30

40

50

、 $R^2$  はメチル基又は水素原子を示し、 $R^3$  はエチル基又はメチル基を示す。]

< 2 > 上記式 ( 1 ) 中の  $R^1$  の置換基が水酸基である < 1 > に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

< 3 > 上記式 ( 1 ) 中の  $R^1$  が、3 - ヒドロキシ - 5 - メチル - ヘキサノイル基、3 - ヒドロキシ - 6 - メチル - ヘプタノイル基又は 3 - ヒドロキシ - 7 - メチル - オクタノイル基である < 1 > に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

< 4 > 上記式 ( 1 ) 中の  $R^1$  が 3 - ヒドロキシ - 5 - メチル - ヘキサノイル基であり、 $R^2$  がメチル基であり、 $R^3$  がエチル基である < 1 > に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

< 5 > 上記式 ( 1 ) 中の  $R^1$  が 3 - ヒドロキシ - 7 - メチル - オクタノイル基であり、 $R^2$  がメチル基であり、 $R^3$  がエチル基である < 1 > に記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

< 6 > 独立行政法人製品評価技術基盤機構 ( N I T E ) の特許微生物寄託センター ( N P M D ) における受託番号が N I T E P - 8 7 0 のリソバクター ( L y s o b a c t e r ) 属に属する R H 2 1 8 0 - 5 株、又はその株と同様の化合物を産生する能力を有する変異株を培養し、その培養物から得られる < 1 > ないし < 5 > の何れかに記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩。

【 0 0 1 6 】

< 7 > < 1 > ないし < 6 > の何れかに記載の環状ペプチド化合物を産生する能力を有する、独立行政法人製品評価技術基盤機構 ( N I T E ) の特許微生物寄託センター ( N P M D ) における受託番号が N I T E P - 8 7 0 のリソバクター ( L y s o b a c t e r ) 属に属する R H 2 1 8 0 - 5 株、又はその株と同様の化合物を産生する能力を有する変異株を培養し、その培養物から製造することを特徴とする < 1 > ないし < 6 > の何れかに記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩の製造方法。

【 0 0 1 7 】

< 8 > < 1 > ないし < 6 > の何れかに記載の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩を、製薬学的に許容し得る担体と共に含んでなる感染症治療薬。

【 0 0 1 8 】

< 9 > リソバクター ( L y s o b a c t e r ) 属に属する微生物であって、< 1 > ないし < 6 > の何れかに記載の環状ペプチド化合物を産生する能力を有する独立行政法人製品評価技術基盤機構 ( N I T E ) の特許微生物寄託センター ( N P M D ) における受託番号が N I T E P - 8 7 0 である R H 2 1 8 0 - 5 株、又はその株と同様の化合物を産生する能力を有する変異株。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 9 】

本発明によれば、感染症等に有効な新規な化学構造を有する化合物を提供することができる。更には、M R S A、V R E 等の多くの多剤耐性菌に有効性を示す新規な化学構造を有する化合物又はその塩、及びそれらの製造方法、並びにそれらの化合物を産生する新規な微生物を提供することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 R H 2 1 8 0 - 5 の培養物から得られた治療効果を示す物質を含有する画分の O D S カラムによる分画結果を示す図である。縦軸は吸収強度、横軸は溶出時間 ( 分 ) を示す。また別枠で表示した各ピークの欄上の数字は各ピーク物質の分子量を示す。

【 図 2 】 R H 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質のアミノ酸組成分析の解析結果を示す図である。

【 図 3 】 R H 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質の  $^1\text{H}$  - N M R、 $^{13}\text{C}$  - N M R 分析の解析結果を示す図である。縦軸はシグナル強度、横軸は化学シフト値 ( p p m ) を示す。

【 図 4 】 R H 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質の T O F ( T i m e o f F l i g h t : 飛行時間型 ) M S の M S - M S 分析の解析結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【図5】RH2180-5 Peak 1物質とPeak 2物質のTOF (Time of Flight: 飛行時間型) MSのMS-MS分析の解析結果を示す図である。

【図6】RH2180-5 Peak 3物質とPeak 4物質のTOF (Time of Flight: 飛行時間型) MSのMS-MS分析の解析結果を示す図である。

【図7】RH2180-5 Peak 6物質とPeak 7物質のTOF (Time of Flight: 飛行時間型) MSのMS-MS分析の解析結果を示す図である。

【図8】RH2180-5 Peak 8物質とPeak 9物質のTOF (Time of Flight: 飛行時間型) MSのMS-MS分析の解析結果を示す図である。

【図9】各解析結果から導き出されたRH2180-5 Peak 5物質の化学構造を示す図である。

10

【図10】各解析結果から導き出されたRH2180-5 Peak 5物質のアミノ酸の立体構造も明らかにした化学構造を示す図である。

【図11】RH2180-5 Peak 5物質の溶菌活性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、本発明について説明するが、本発明は、以下の具体的態様に限定されるものではなく、技術的思想の範囲内で任意に変形することができる。

【0022】

<本発明の環状ペプチド化合物>

本発明は、下記式(1)で表されることを特徴とする新規な化合物に係るものであり、37員環の環状ペプチド構造を基本骨格とし、 $R^1$ から $R^3$ の基の違いにより、複数の化合物が確認されている。これらは、本発明者が見出した、後述する新規微生物株であるイソバクター エスピーRH2180-5の培養物から、後述する最終精製段階であるRP-HPLCで分取されたピーク画分中から単離されたが、本発明の「下記式(1)で示される環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩」を得る方法は、上記方法には限定されず、如何なる方法で得られたものでもよく、微生物が産生したものには限定されない。

20

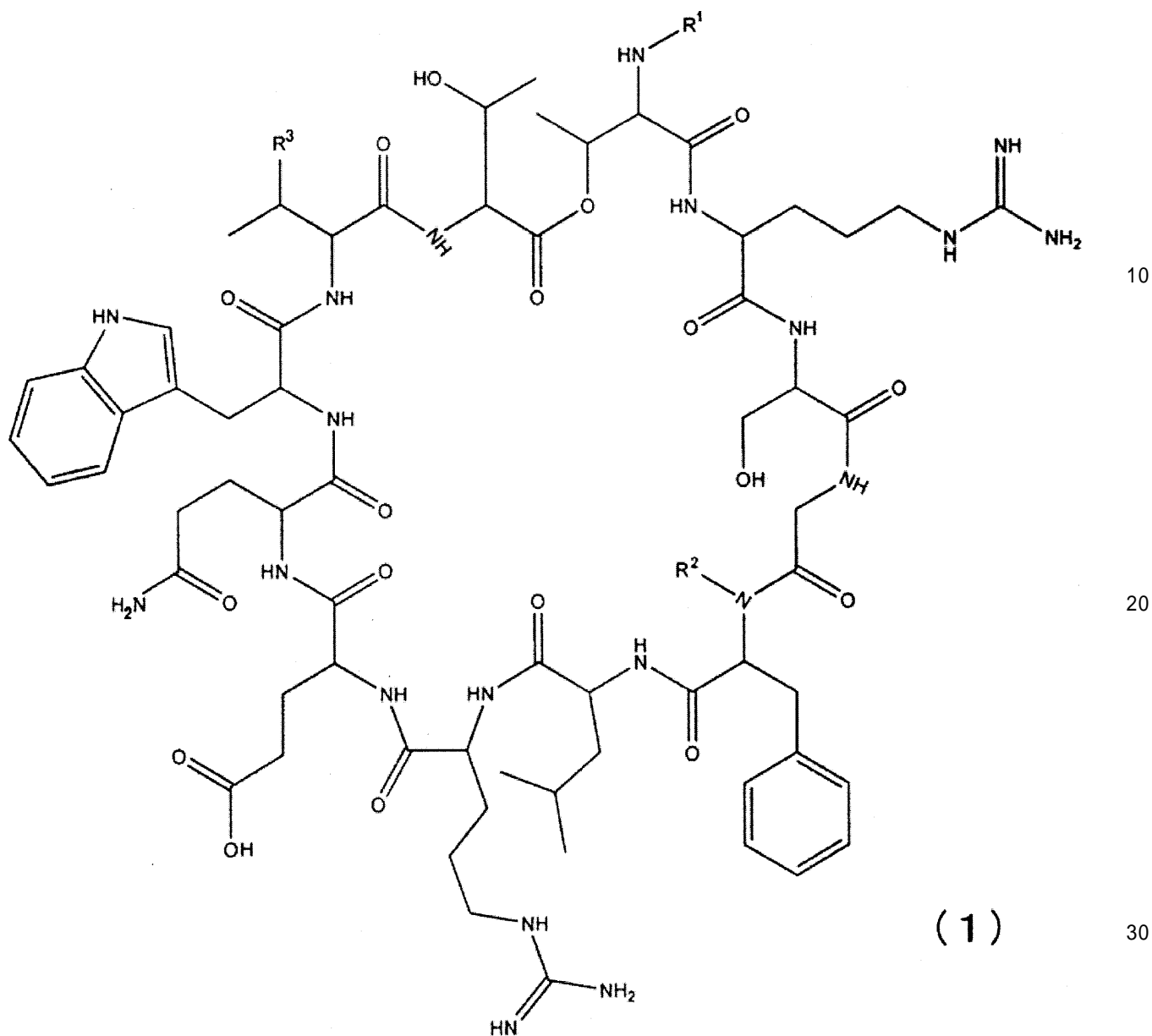
【0023】

なお、それぞれの単離・精製された化合物は、以下、便宜上、上記微生物株の株名にピーク名をつけ、例えば、ピーク1から得られた化合物であれば、「RH2180-5 Peak 1物質」、又は単に「P1」と表記することとする。

30

【0024】

## 【化 2】



【式(1)中、 $R^1$ は置換基を有していてもよい炭素数が7、8又は9のアシル基を示し、 $R^2$ はメチル基又は水素原子を示し、 $R^3$ はエチル基又はメチル基を示す。】

## 【0025】

上記式(1)中の $R^1$ は、置換基を有していてもよい炭素数が7、8又は9のアシル基を示す。上記アシル基の炭素数には「 $C=O$ 」の炭素数(1個)も含まれる。置換基を除いた「炭素数が7、8又は9のアシル基」は、「 $R'-C(=O)-$ 」で表わされ、ここで、 $R'$ は、炭素数が6、7又は8のアルキル基を示す。また、 $R'$ は直鎖であっても分岐を有していてもよいが、分岐を有していることが好ましい。また、分岐された部分はメチル基であることが好ましく、特に限定はないが、 $R'$ の「 $C=O$ 」とは反対側の末端は、「 $CH_3(CH_3)CH-$ 」となっていることが特に好ましい。また、 $R'$ すなわち $R^1$ が分岐を有する場合には、上記 $R^1$ の炭素数(7、8又は9)には、分岐された部分の炭素数も含まれる。また、上記式(1)中の $R^1$ の置換基は、水酸基であることが好ましい。

## 【0026】

具体的には、上記式(1)中の $R^1$ は、3-ヒドロキシ-5-メチル-ヘキサノイル基、3-ヒドロキシ-6-メチル-ヘプタノイル基又は3-ヒドロキシ-7-メチル-オクタノイル基であることが好ましい。



## 【 0 0 2 7 】

また、上記式(1)で示される「環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩」は、 $R^1$ が3-ヒドロキシ-5-メチル-ヘキサノイル基であり、 $R^2$ がメチル基であり、 $R^3$ がエチル基であるものが好ましく、 $R^1$ が3-ヒドロキシ-7-メチル-オクタノイル基であり、 $R^2$ がメチル基であり、 $R^3$ がエチル基であるものが好ましい。

## 【 0 0 2 8 】

式(1)中に示される $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ と各ピークから得られた物質との関係を、表1に示す。この内、RH2180-5 Peak 5物質とRH2180-5 Peak 9物質については $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ の構造が確定しているが、他のピークから得られた物質については $R^1$ の構造が完全には確定していないので、表1中の $R^1$ の構造式は主に精密質量分析の結果の解析と生合成経路からによるものである。後述する各ピーク物質の抗菌スペクトルの検討結果から、 $R^1$ の違いは抗菌スペクトルに特に影響を与えていないという傾向が明確に認められている。従って、少なくともこれらの側鎖は、置換基を有していてもよいアシル基であればよく、好ましくは置換基を有していてもよい炭素数が7ないし9のアシル基であればよい。

10

## 【 0 0 2 9 】

【表 1】

ピーク No.	高分解能 質量分析	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
P 1	1603.8612	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CHCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-5-methylhexanoyl	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
P 2	1603.8598	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CHCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-5-methylhexanoyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
P 3	1631.8909	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-7-methyloctanoyl	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
P 4	1631.8917	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-7-methyloctanoyl	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
P 5	1617.8755	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CHCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-5-methylhexanoyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
P 6	1631.8893	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-6-methylheptanoyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
P 7	1631.8920	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-6-methylheptanoyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
P 8	1645.9068	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-7-methyloctanoyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
P 9	1645.9074	CH <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CHOHCH <sub>2</sub> CO 3-Hydroxy-7-methyloctanoyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>

10

20

30

表 1 中、「高分解能質量分析」は、HR TOF MS m/z (M+H)<sup>+</sup>

## 【0030】

< 本発明の環状ペプチド化合物の調製方法 >

本発明の環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩の調製方法は特に限定されず、微生物が産生したものであってもよいし、合成したものであってもよいし、それらを組み合わせたものでもよい。

40

## 【0031】

< 本発明の環状ペプチド化合物の単離精製方法 >

本発明の新規な環状ペプチド化合物の単離精製方法は、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルにおける治療効果を指標として選択されたものであるが、その方法に特に限定されるものではなく、一般的に微生物の培養物から目的の化合物を精製する方法として用いられている方法を適宜組み合わせる実施すればよい。

## 【0032】

具体的には、溶媒抽出、転溶、水沈殿、ODSカラム等によるクロマトグラフィー、ODSカラム等を用いたRP-HPLCによる分取等が挙げられる。上記溶媒抽出の溶媒や

50

転溶の溶媒としては特に限定はないが、アセトン等の水溶性溶媒；ブタノール等の親水性溶媒；それらの混合溶媒；水と親水性溶媒との混合溶媒；水と水溶性溶媒との混合溶媒；等が好ましい。また、ODSカラムの代わりに、オクチル基やブチル基で修飾した担体、ポリスチレン系のポリマー担体等を充填したカラムを用いてもよい。

【0033】

なお、上記した単離精製方法は一例に過ぎず、最終的に目的とする本発明の新規な環状ペプチド化合物が得られる方法であれば、如何なる単離精製方法であってもよい。

【0034】

<単離精製された本発明の環状ペプチド化合物の構造解析>

以上の精製方法を実施した場合、最終的にRP-HPLCによって、RH2180-5の培養物から少なくとも9つのピークに分けられる9つの化合物を分取することができる(図1)。これらは、RP-HPLCより前段階の単離精製方法によっては単一の画分中に存在する化合物群であって、また、UV吸収パターンが類似していることから、互いに類似する化合物群である。

【0035】

これらの9つのピークのうちの主要なピークであるピーク5からのRP-HPLC精製標品を構造解析の例として挙げる。その構造解析方法は既存の構造解析手段を適宜組み合わせればよいが、次の解析手段により効率よく実施することができる。すなわち、精密質量分析による分子量測定、酸加水分解処理後のアミノ酸分析(図2)、<sup>1</sup>H-NMRと<sup>13</sup>C-NMRによる解析(図3)、TOF(Time of Flight:飛行時間型)MS解析(図4はピーク5、図5はピーク1と2、図6はピーク3と4、図7はピーク6と7、図8はピーク8と9の、TOF-MS解析結果。)、その他、UVスペクトル(図1)や、赤外線吸収スペクトル(IR)で解析することができる。

【0036】

以上の構造解析手段を実施した結果、ピーク5から得られた物質は、精密質量分析により、分子量が1616.9[ESI-TOF-MSで、(M+H)<sup>+</sup>が、m/z=1617.8755]；アミノ酸分析により、Thr、Glu、Glu、Argがそれぞれ2分子、Ser、Gly、Ileがそれぞれ1分子検出された(図2)。そして、最終的にピーク5から得られた物質は、式(1)のR<sup>1</sup>が3-ヒドロキシ-5-メチル-ヘキサノイル、R<sup>2</sup>がメチル、R<sup>3</sup>がエチルである新規な環状ペプチド骨格を有する新規な化合物であることが判明した。そしてこの新規な化合物を、「RH2180-5 Peak 5物質」(以下、単に「P5」と記載することもある。)と命名した。

【0037】

また、同様に、ピーク9から得られた物質は、RH2180-5 Peak 5物質のR<sup>1</sup>の炭素数が2つ延長した形の化合物であることが確定し、「RH2180-5 Peak 9物質」(以下、単に「P9」と記載することもある。)と命名した。また、他のピークから得られた物質も、同じ環状ペプチド構造を基本骨格として有する化合物であることが判明し、同様に「RH2180-5」にPeak番号nを付する形で命名した(以下、単に「Pn」と記載することもある。))。

【0038】

<本発明の環状ペプチド化合物RH2180-5 Peak 5物質の物理化学的性状>

以上の本発明の新規な環状ペプチド構造を有する新規な化合物のうち、RH2180-5 Peak 5物質の物理化学的性状は次の通りである。

【0039】

(1) 高分解能質量分析値 HR TOF MS m/z (M+H)<sup>+</sup> :

1617.8755

TOF (Time of Flight:飛行時間型)MS解析:図4

(2) <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR:図3

【0040】

(3) 溶媒への溶解性:

水、エタノール、メタノール、アセトニトリルに溶解  
クロロホルムに不溶

(4) 外観：白色粉末

【0041】

<本発明の環状ペプチド化合物の微生物を用いた製造方法>

本発明の新規な環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩は、化学合成によっても、それを産生する微生物の培養によって得られるものであってもよく、製造方法は特に限定されないが、上記の環状ペプチド化合物を産生する能力を有する、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)の特許微生物寄託センター(NPMD)における受託番号がNITE P-870のリソバクター(Lysobacter)属に属するRH2180-5株、又はその株と同様の化合物を産生する能力を有する変異株を培養し、その培養物から製造することが好ましい。

10

【0042】

すなわち、本発明は、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)の特許微生物寄託センター(NPMD)における受託番号がNITE P-870のリソバクター(Lysobacter)属に属するRH2180-5株、又はその株と同様の化合物を産生する能力を有する変異株を培養し、その培養物から得られる前記式(1)で表わされる環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩でもある。

【0043】

<RH2180-5について>

20

以下、このRH2180-5について詳述する。

形態：本RH2180-5は、グラム陰性の桿菌であり、鞭毛は認められないが滑走性が認められる。子実体の形成は認められない。また抗酸性を示さない。

【0044】

培地における生育状況：

- (1) 肉汁寒天平板上では薄黄色のコロニーを形成する。拡散性の色素は認められない。
- (2) 肉汁ゼラチン穿刺培養では内部に渡ってゼラチンを液化しながら生育する。

【0045】

生理学的性質：本RH2180-5の生理学的、化学分類学的性質は以下の通りである

30

生理学的性質：本RH2180-5の生理学的、化学分類学的性質は以下の通りである

- (1) 生育pH(最適生育pH)：5~9(6~8)
- (2) 生育温度(至適生育温度)：10~40(25~30)
- (3) 酸素に対する態度：好氣的
- (4) MRテスト(Methyl red test)：-
- (5) VPテスト(Voges-Proscauer test)：+
- (6) 色素の生成(Pigment)：+
- (7) オキシダーゼ(Oxidase test)：+
- (8) カタラーゼ(Catalase test)：+
- (9) ウレアーゼ(Urease test)：-
- (10) フォスファターゼ(Phosphatase test)：+
- (11) カゼイン加水分解(Casein hydrolysis)：+
- (12) セルロース加水分解(Cellulose hydrolysis)：-
- (13) ゼラチン加水分解(Gelatin hydrolysis)：+
- (14) でんぷん加水分解(Starch hydrolysis)：-
- (15) デオキシリボヌクラーゼ(Deoxyribonuclease test)：+
- (16) 硝酸塩還元(Nitrate reduction)：-
- (17) 脱窒(Denitrification)：-
- (18) 硫化水素生成(H<sub>2</sub>S production)：-
- (19) インドール生成(Indole production)：-

40

50

(20) クエン酸塩の利用 (Citrate utilization) : +  
 (21) OF - test : oxidation  
 (22) 下記の糖類等からの酸及びガスの生成能  
 L - アラビノース (L - arabinose) : -  
 D - キシロース (D - xylose) : -  
 D - グルコース (D - glucose) : +  
 D - マンノース (D - mannose) : +  
 D - フラクトース (D - fructose) : +  
 D - ガラクトース (D - galactose) : -  
 D - マルトース (D - maltose) : +  
 D - スクロース (D - sucrose) : +  
 D - ラクトース (D - lactose) : +  
 D - トレハロース (D - trehalose) : +  
 D - ソルビトール (D - sorbitol) : -  
 グリセロール (glycerol) : -  
 スターチ (starch) : -

10

## 【0046】

分子生物学的解析結果：分子生物学的な系統分類の指標として用いられている16S rRNAに関するRH2180-5の解析結果は以下の通りである。

<<16S rRNA配列>>

20

(12) 16S rRNA配列の解析結果

RH2180-5のコロニーから、コロニーPCRにより、16S rRNA領域の塩基配列を増幅し、シーケンサーによる解析を行った結果、5'末端側、3'末端側のいくつかの塩基を除く16S rRNAのほぼ全長に当たる塩基配列が見出された。この塩基配列を配列表の配列番号1に示す。配列表の配列番号1の塩基配列は、16S rRNAの全長ではないため、16S rRNA「領域」とした。この塩基配列をNCBIのBLASTで相同性検索を行ったところ、RH2180-5の16S rRNA領域の塩基配列は、リソバクター属である *Lysobacter enzymogenes* DSN2043T株の塩基配列と相同率99%を示した。なお、上記 *Lysobacter enzymogenes* には、抗生物質産生の報告はないので、RH2180-5とは異なるものである。

30

## 【0047】

以上のRH2180-5の性質をバーゼス・マニュアル・オブ・システムティックバクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 3 1989) による分類及びその他の文献の記載内容に照らし合わせ、更に、16S rRNA解析の結果を考慮して総合的に判断した結果、RH2180-5は、リソバクター (*Lysobacter*) 属に属する微生物であると判断した。

## 【0048】

<RH2180-5の新規性等>

40

また、RH2180-5の16S rRNA領域の塩基配列に一致する16S rRNA領域の塩基配列を有する微生物が存在しないこと、RH2180-5の産生する化合物が、上記したように、新規な環状ペプチド構造を基本骨格とする新規な化合物であること、また、その化合物がMRSAだけでなくVREにも抗菌活性を示し、MRSAによる感染症に対しマウスにおいて治療効果が確認されたこと等を含め総合的に判断した結果、RH2180-5は、新規な微生物株であると判断した。

## 【0049】

RH2180-5は、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPMD) に国内寄託され、受託番号：NITE P-870 (寄託日：2010年1月25日) を受けており、入手可能で

50

ある。

【0050】

「RH2180-5」は、その後、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)の特許微生物寄託センター(NPMD)に、原寄託申請書を提出して、国内寄託(原寄託日:2010年1月25日)から、ブダベスト条約に基づく寄託への移管申請を行ない(移管日(国際寄託日):2011年5月20日)、生存が証明され、ブダベスト条約に基づく寄託(国際寄託)への移管申請が受領された結果、受託番号「NITE BP-870」を受けているものである。

【0051】

バクテリアの一般的な性状として、その菌株としての性質は変異し易いため、RH2180-5は、先に示した生理学的性状の範囲内に留まらない可能性も有している。また、かかる「変異」には、自然的な変異と人工的な変異の両方を含むことは言うまでもない。本発明の前記式(1)で示される環状ペプチド化合物は、RH2180-5(受託番号:NITE P-870)から変異した微生物が産生したものも含まれる。

【0052】

<RH2180-5の培養方法>

以下に、RH2180-5の培養方法について記載する。本発明の新規な環状ペプチド構造を有する新規な化合物を産生するRH2180-5の培養方法は、リソバクター属の微生物に対して行われる一般的な培養方法に準じて行えばよい。具体的には、RH2180-5を、YME培地、SGM培地、CDY培地、YPGM培地等の栄養源含有培地に接種し、好氣的条件下で培養を行う。培地中の炭素源としては、例えば、D-グルコース、D-フラクトース、シュクロース、デンプン、デキストリン、グリセリン、糖蜜、水飴、油脂類等の有機炭素化合物が用いられ、窒素源としては、肉エキス、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、胚芽、大豆粉、尿素、アミノ酸、アンモニウム塩等の有機・無機窒素化合物を用いることができる。また、塩類は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩、鉄塩、銅塩、亜鉛塩、コバルト塩等の無機塩類を必要に応じて適宜添加する。更に、ピオチン、ビタミンB1、シスチン、オレイン酸メチル、ロード油等の生育促進物質を添加することが、目的物の産生量を増加させる点で好ましい。また、シリコン油、界面活性剤等の消泡剤を添加してもよい。

【0053】

培養条件は、先に記したように好氣的条件下で培養することが好ましく、液体培養法であれば通気攪拌培養が望ましい。小規模であればフラスコによる振とう培養法を用いてもよい。培養温度は20~40で可能であるが、25~35間に保つことが好ましく、30近辺で行うことがより好ましい。培養pHは、6~8が好ましく、7付近で行うことが特に好ましい。培養期間は、用いた培地組成、培養温度等により変動するファクターであるが、RH2180-5の場合、通常は1~20日間程度、好ましくは3~7日間程度の短期間に十分な量の目的物を確保することができる。

【0054】

<RH2180-5の培養物からの本発明の環状ペプチド化合物の調製方法>

RH2180-5の培養物から、本発明の「前記式(1)で示される環状ペプチド化合物」を得る方法としては、通常微生物培養物から生理活性物質を得る方法が挙げられる。ここで培養物とは、培養上清、培養菌体、培養菌体破砕物を含むものである。例えば、培養物に抽出処理としてアセトン等の適当な有機溶媒を加えて懸濁した後に、遠心分離や過膜分離等を行って菌体と分離した抽出上清に対して、通常用いられる単離精製処理を加えればよい。また必要に応じて残った菌体残渣を摩砕処理等してから再度抽出処理を行ってもよい。

【0055】

また、本発明の「前記式(1)で示される環状ペプチド化合物」の調製にあたり、通常実施されるMICによる抗菌活性の確認だけでなく、特許文献4に記載のカイコ黄色ブドウ球菌感染モデルを用いた治療効果(ED<sub>50</sub>)を指標として単離精製方法の取捨選択を

10

20

30

40

50

行っている（実施例 1 の表 2 参照）。

【0056】

実施例 1 の表 2 は、RH2180-5 の培養液から分画・精製される各精製段階の検体の抗菌活性 MIC と、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルにより測定した治療効果 ED<sub>50</sub> をまとめたものである。その結果は、ED<sub>50</sub> がアセトン抽出段階の 90 から 0.3 へと、300 倍に濃縮されているのに対し、MIC は、この場合に行った単離精製方法では、25 から 5 と、5 倍に濃縮されているに過ぎないことを示している。

【0057】

つまり、本発明の前記式（1）で示される環状ペプチド化合物は、MIC だけでなくカイコ黄色ブドウ球菌感染モデルを用いた治療効果を指標として選択された単離精製方法を用いることによって効果的に見出されたものと考えられることができる。なぜならば、従来から行われている MIC のみを指標として目的物の単離精製を行った場合には、抗菌活性は高いが治療効果の点では有効でない抗菌活性成分が濃縮されてしまい、生体内で治療効果の高い抗生物質を見逃していた可能性が考えられるからである。

10

【0058】

< 抗菌スペクトル >

本発明の前記式（1）で示される環状ペプチド化合物の示す抗菌スペクトルは、先に記載した MIC によって検討することができる。それによって、例えば、RH2180-5 Peak 5、Peak 6、Peak 9 の各物質は、黄色ブドウ球菌、腸球菌等のグラム陽性細菌に対して抗菌活性を示し、更に、MRSA だけでなく VRE に対しても通常の細菌とまったく同じ抗菌活性を示し、多くの多剤耐性菌に有効な物質であることを確認することができる（試験例 1 の表 3、試験例 4 の表 6 参照）。

20

【0059】

先の各ピーク物質、すなわち、前記式（1）で示される環状ペプチド化合物の、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA 3、MRSA 4）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）と同じ菌種の薬剤感受性菌である黄色ブドウ球菌（MSSA 1）と腸球菌（EF 1）に対する MIC による抗菌スペクトルを検討した結果（ピーク 1 物質は未実施）、MSSA 1 と MRSA 3 及び MRSA 4、EF 1 と VRE 間で各ピーク物質はほぼ同様の MIC 値を示し、本発明の一群の化合物が、バンコマイシン耐性を含む薬剤耐性の影響を受けていないことを確認することができた（試験例 2 の表 4 参照）。

30

【0060】

本発明の前記式（1）で示される新規な環状ペプチド構造を有する新規な化合物は、少なくとも、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）の両者に抗菌活性を示す化合物が含まれる。

【0061】

以上から、本発明の新規な環状ペプチド構造を有する新規な化合物は、例えば、本発明の新規な微生物 RH2180-5（受託番号 NITE P-870）の培養液から製造することができ、少なくとも多剤耐性菌の MRSA 及び VRE に対して抗菌活性を有する新規な化合物を含んでいることが確認できる。なお、先に挙げた微生物の培養方法、精製方法等は、本発明の化合物を見出すために選択された一例であって、効率よく大量に製造する必要がある場合等、目的に応じて別種の製造方法を選択することは当然行われることである。

40

【0062】

< 感染症治療薬 >

前記式（1）で表わされる環状ペプチド化合物又はその製薬学的に許容される塩を、製薬学的に許容し得る担体と共に含んでなる感染症治療薬は、感染症に対して優れた治療効果を奏する。特に、本発明の前記式（1）で表わされる、新規な環状ペプチド構造を有する化合物又はその製薬学的に許容される塩は、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルだけでなく、後述するようにマウス黄色ブドウ球菌感染モデルでも、バンコマイシンに比して高い治療効果が確認されたものがあり、感染症治療薬の有効成分として好適に用いることがで

50

きる。

【0063】

上記の感染症治療薬中の、本発明化合物の含有量には特に制限はなく、目的や投与方法に応じて含有量を適宜選択して用いればよい。また、通常の抗生物質を製剤化する際に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を、適宜、剤形等の要求に応じて本発明の化合物の薬理効果を損なわない範囲内で選択して用いればよい。

【0064】

前記の感染症治療薬の剤形は、投与の目的や方法に応じて適宜選択すればよく、例えば、粉末、顆粒、カプセル、錠剤、液剤等の経口投与用；注射剤、経静脈剤、坐剤、経皮、経鼻、経腸、吸入剤等の非経口投与用の何れにも本発明の化合物は用いることができる。経口投与のための賦形剤としては、乳糖、ブドウ糖、デンプン、ポリビニルピロリドン等、公知の賦形剤を用いることができ、液剤とする場合は、本発明の化合物に、不活性な溶媒、例えば、精製水、エタノール等と共に、薬学的に許容される乳剤、懸濁剤、可溶化剤、甘味剤、pH調整剤、芳香剤、防腐剤等を含有させて用いることができる。

10

【0065】

注射剤として用いる場合は、注射用の蒸留水や生理食塩水のような無菌の水性液剤を用いることができ、非水性の液剤としては、オリーブ油等の植物油；エタノール、ポリエチレングリコール、ブチレングリコール等のアルコール類等を用いることができる。更に、等張化剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、シクロデキストリン等の溶解補助剤を含んでいてもよい。

20

【0066】

以上のように製剤化した本発明の化合物の投与量は、症状、年齢、性別、剤形、投与方法、1日の投与回数等を考慮して適宜決定すればよいが、一般的な投与量は、成人1日当たり10mg～1000mgである。しかしながら、多剤耐性菌に対する治療で多用される重症化患者に点滴によって経静脈剤として用いられる場合等には更に多い投与量を必要とする場合もあり得る。

【実施例】

【0067】

以下、実施例、試験例及び検討例に基づき本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例等の具体的範囲に限定されるものではない。

30

【0068】

実施例1

<RH2180-5 Peak 5物質の単離精製>

(1) 抗菌活性を有する微生物のMICによる探索

各地から採取した土壌を生理食塩水に懸濁し、その上清をGA培地及びHV培地に塗布し、30℃でインキュベート後に生育した菌を分離し、YME培地又はSGM培地、CDY培地にて30℃で5日間培養した。アセトン等を等量加え、懸濁後に遠心分離しその上清をエバポレーションした。得られた残存物を生理食塩水で希釈後に黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を微量液体希釈法によるMICにて評価した。その結果、14346株中、3487株の培養上清に抗菌活性が認められた。

40

【0069】

(2) カイコ黄色ブドウ球菌感染モデル(以下、「カイコモデル」と略記する。)を用いた治療活性物質を産生する微生物株の検討

先の抗菌活性が認められた3487株の検体を、特許文献4に記載のカイコモデルに供してその治療効果を検討したところ、45株の培養上清に治療効果が認められた。

【0070】

(3) カイコモデルを用いた治療効果を指標とした治療活性物質の精製

上記45株中、沖縄で採取された土壌から分離されたRH2180-5について、培養上清からの治療活性物質の精製を実施した。RH2180-5は、後述する16S rRNA配列の解析、産生物質の傾向等から、新規リソバクター(Lysobacter)属

50



の微生物と判定された。

【 0 0 7 1 】

R H 2 1 8 0 - 5 を、Y M E 培地 1 2 0 0 m L に接種して培養し、培養物の 5 0 質量 % アセトン抽出物からカイコモデルにおける治療効果を指標に治療効果を示す抗生物質の精製方法を検討した。その結果、ブタノール転溶、水沈殿、O D S カラムによるクロマトグラフィー、更に O D S カラムを用いた R P - H P L C ( 逆相 H P L C ) により、治療効果を示す抗生物質が精製された。その結果を表 2 に示す。

【 0 0 7 2 】

【表 2】

カイコ幼虫黄色ブドウ球菌感染モデルを用いた治療効果を指標にした精製

	全活性 (unit)	回収率 (%)	重量 (mg)		ED <sub>50</sub> ( $\mu$ g/g-larva)	MIC ( $\mu$ g/mL)
Aceton extract	87000	100	8100(	100)	90	25
Butanol extract	88000	100	340(	4)	4	0.6
Water precipitation	41000	47	80(	1)	1.8	N.D.
ODS column chromagtoraphy	45000	51	22(	0.2)	0.5	N.D.
RP-HPLC						
peak5	16000	18	5.3(	0.06)	0.3	5
peak9	10000	11	3.5(	0.04)	0.3	5

1 2 0 0 m L 培養液からの精製

N.D.:not determined

【 0 0 7 3 】

表 2 に示したように、以上の精製工程により、治療効果 ( E D <sub>5 0</sub> 値 ) の比活性は、アセトン抽出物の 3 0 0 倍に上昇した。一方、抗菌活性 ( M I C ) の上昇は 5 倍に留まった。これは、精製の出発材料であるアセトン抽出物の示す抗菌活性には最終精製物の治療効果を示す抗生物質以外の物質も関与し、今回選択された精製工程により、それらの物質を除去できているためと推定された。表 2 中、全活性「 u n i t 」とは、体重 1 g の黄色ブドウ球菌に感染したカイコの、 5 0 % の確率で生存に必要な活性量と定義される。

【 0 0 7 4 】

また、上記 R P - H P L C において、U V 吸収パターンの類似した 9 つの化合物が検出されていることから、R H 2 1 8 0 - 5 は少なくとも 9 つの関連化合物を産生していることが確認された ( 図 1 の H P L C の U V 吸収パターン参照 ) 。

【 0 0 7 5 】

実施例 2

< R H 2 1 8 0 - 5 の培養と R H 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質の製造 >

R H 2 1 8 0 - 5 の斜面培養から白金耳で菌を掻き取り、1 0 0 m L の Y M E 培地を入れた 5 0 0 m L 容の三角フラスコに接種し、3 0 で 3 日間振とう培養を行い種培養液とした。次いで、この種培養液 1 . 0 m L を、先の液体培地 1 0 0 m L を入れた 5 0 0 m L 容の三角フラスコ 1 2 本に接種し、3 0 で 5 日間振とう培養を行った。

【 0 0 7 6 】

このようにして得た培養液にアセトンを等量混合し、この混合液を十分に攪拌した後に遠心分離を行い、遠心上清をエバポレーションしてアセトンを除去した。次いで、この試料をブタノール転溶に供した。ブタノール転溶はアセトン抽出物を 8 0 m L の水に懸濁し、等量のブタノールを添加して十分に振とうした後、静置、分液ロートにてブタノール層を分取し、減圧乾固後水沈殿に供した。水沈殿は先の試料を 8 0 m L の水に懸濁し、遠心後に水を取り除き、沈殿物を分取した。

【 0 0 7 7 】

10

20

30

40

50

ブタノール抽出物残渣75mgのサンプルを60%メタノールに溶解し、Waters、Sep-pak (Waters社：登録商標) C18、25mLを用いて、0.1% TFAを含む60%~100%メタノールで、10%ごとに20mLの液で溶出させた。その結果、70%~80%メタノール画分で治療効果を示す画分が溶出された。

#### 【0078】

先の治療効果を示す画分をプールして乾固させ、内22mgを50%メタノールに溶解し、Senshu Pak SP-100 ODSカラム(センシュー科学：直径20mm X長さ250mm)を用いて、75%~95%メタノール+0.1% TFAにて溶出させた。この条件のRP-HPLCにより治療効果を示す画分は、それぞれ単一物質からなる9つのピークを示す物質に分画された。

10

#### 【0079】

以上のRP-HPLCにおいて、治療効果を示す画分は、ピーク5を主要成分とする9つの類似したUV吸収パターン(UV装置Waters 2996 photo diode array)を有する化合物群からなっていることが確認された(図1参照)。

以上の操作により、RH2180-5 Peak 5物質を5.3mg得た。また、同様の方法で、ピーク1、ピーク2、ピーク3、ピーク4、ピーク6、ピーク7、ピーク8、ピーク9の各ピークからそれぞれのピーク物質を得た。

#### 【0080】

##### 検討例1

< RH2180-5 Peak 5物質の構造解析 >

20

RH2180-5 Peak 5物質を、ブルカー・ダルトニクス社(Bruker Daltonics) BioTOF-Q質量分析器による精密質量分析に供した結果、分子量は1617.8743であることが分かった。

#### 【0081】

また、6N塩酸下、105℃で一晩加水分解処理をした後に、日立アミノ酸分析機によりアミノ酸分析を行ったところ、各々2分子のThr、Glu、Argと、各々1分子のSer、Gly、Ileが検出された(図2)。

#### 【0082】

更に、日本電子ECA-500NMRによる<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C-NMR解析(図3)、TOF-MS解析(図4)の結果、RH2180-5 Peak 5物質は、式(1)のR<sup>1</sup>が3-ヒドロキシ-5-メチル-ヘキサノイル、R<sup>2</sup>がメチル、R<sup>3</sup>がエチルである環状ペプチド化合物であり、図9に示す新規骨格を有する化合物であることが明らかとなった。

30

#### 【0083】

更に、酸加水分解を行ったRH2180-5 Peak 5物質について、キラルカラムによるD、L体の決定を行ったところ、Ile, Ser, Leu, 2個のThrはL体で、N-MePhe, 2個のArg, TrpはD体であることが明らかになった。

GlnとGluについては、酸加水分解の結果では両方ともGluとなり、D、L体が1:1で検出されたため、グルタミンおよびグルタミン酸を含むペプチドに対して、ビス(1,1-トリフルオロアセトキシ)ヨードベンゼンを反応させることにより、グルタミンをジアミノ酪酸に変換し、加水分解後、反応しなかったグルタミン酸について、キラルカラムによる絶対配置の決定を行ったところ、GlnがD体、GluがL体であることが明らかになった。(この分解法によるペプチドのD、L体の決定法は本願において初めて行われた新規の方法である。)

40

#### 【0084】

脂肪酸鎖の水酸基については、改良モッシャー法により絶対配置Rを決定した。

その結果、RH2180-5 Peak 5物質は、各アミノ酸が図10に示す立体構造を有する新規な環状ペプチド化合物であることが分かった。

#### 【0085】

##### 検討例2

< RH2180-5 Peak 9物質の構造解析 >

50

構造解析に供する試料としてRH2180-5Peak9物質を用いる以外は検討例1と同様の構造解析手段により構造解析を行った(図5参照)。その結果、式(1)のR<sup>1</sup>が3-ヒドロキシ-7-メチル-オクタノイルである以外は、RH2180-5Peak5物質と同じ化学構造を有する環状ペプチド化合物であることが確認された。

【0086】

また、他のピーク物質についても同様の解析を行い、表1に示すR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>を有する以外は全て、RH2180-5Peak5物質、RH2180-5Peak9物質と同じ環状ペプチド骨格を有する化合物であることが確認された(図6、7、8参照)。

【0087】

試験例1

<本発明の環状ペプチド化合物の抗菌スペクトル検討>

先のRH2180-5Peak5物質の、MRSA、VREを含む各種の微生物に対する抗菌スペクトルの検討を行った。また、薬剤耐性の影響についても検討した。後者の検討には黄色ブドウ球菌と腸球菌を選択し、黄色ブドウ球菌については、薬剤耐性を示さない黄色ブドウ球菌(以下、「MSSA1」と略記する。)と、メチシリンを含む多くの薬剤に耐性を示すMRSA2種(MRSA3、MRSA4;耐性薬剤については表3を参照)について、また、腸球菌については、薬剤耐性を示さない腸球菌(以下、「EF1」と略記する。)と、バンコマイシンに耐性を示す腸球菌(以下、「VRE」と略記する。)について、各ピーク物質の示すMIC値をCLSI(旧NCCLS米国臨床検査標準委員会)に基づく微量検体希釈法によって測定した。

【0088】

また、RH2180-5Peak6物質とRH2180-5Peak9物質についても、MSSA1とEF1、及びその薬剤耐性菌(MRSA3、MRSA4とVRE)についてMIC値を測定した。試験に供した各種の微生物とMICの測定結果を表3に示す。

【0089】

10

20

【表 3】

表 3

株	耐性を示す薬剤	MIC (µg/mL)		
		peak5	peak6	peak9
黄色ブドウ球菌(MSSA1)	なし	5	5	5
黄色ブドウ球菌(MRSA3)	OX, FL, KM, TC, EM	5	5	5
黄色ブドウ球菌(MRSA4)	OX, FL, KM, CP, CPLX	5	5	5
腸球菌(EF1)	なし	12.5	12.5	12.5
腸球菌(VRE)	VM	12.5	12.5	12.5
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803		25		
<i>Bacillus subtilis</i> JCM2499		6.3		
<i>Bacillus cereus</i> JCM20037		3.1		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		25		
<i>Streptococcus agalactiae</i> JCM5671		100		
<i>Streptococcus sanguinis</i> JCM5708		100		
<i>Salmonella enteria</i>		>100		
<i>Escherichia coli</i>		>100		
<i>Serratia marcescens</i>		>100		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		>100		
<i>Candida albicans</i>		>100		

OX, オキシサリン FL, フロモキセフ KM, カナマイシン TC, テトラサイクリン  
 CP, クロラムフェニコール EM, エリスロマイシン CPLX, シプロフロキサシン  
 VM, バンコマイシン

10

20

30

40

50

【0090】

表3の結果から、RH2180-5 Peak 5物質は、黄色ブドウ球菌、腸球菌に抗菌活性を示すことからグラム陽性の球菌に抗菌活性を示すことが確認された。また、多剤耐性菌のMRSA2種とVREに対しても、通常の菌(MSSA1とEF1)と同じMIC値を示し、バンコマイシン耐性を含む多剤耐性の影響を受けないことが確認された。また、RH2180-5 Peak 6物質とRH2180-5 Peak 9物質も、多剤耐性菌と

通常の菌に対して R H 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質と同じ抗菌活性を有することが確認された。

【 0 0 9 1 】

試験例 2

< 各ピーク物質の多剤耐性菌と薬剤耐性を有さない菌に対する抗菌活性の比較検討 >

試料量の少ないピーク 1 物質を除くピーク 2 物質からピーク 9 物質の 8 つの本発明の新規な環状ペプチド化合物について、多剤耐性菌と薬剤耐性を有さない菌に対する抗菌活性の比較検討を行った。

【 0 0 9 2 】

試験対象菌には、試験例 1 と同じ黄色ブドウ球菌と腸球菌を選択し、微生物も同じ M S S A 1 と E F 1、M R S A 3 と M R S A 4 及び V R E について各ピーク物質の示す M I C 値を C L S I (旧 N C C L S 米国臨床検査標準委員会) に基づく微量検体希釈法によって測定した。その結果を表 4 に示す。

【 0 0 9 3 】

【表 4】

化合物	MSSA1	MRSA3	MRSA4	EF1	VRE
P1	-	-	-	-	-
P2	12.5	12.5	6.3	50	50
P3	25	25	25	50	50
P4	12.5	25.0	12.5	50	25
P5	6.3	6.3	6.3	12.5	12.5
P6	6.3	6.3	3.1	50	25
P7	12.5	12.5	12.5	50	25
P8	12.5	12.5	12.5	50	25
P9	6.3	6.3	6.3	12.5	12.5

M I C (  $\mu$  g / m L )

【 0 0 9 4 】

M S S A 1 : 黄色ブドウ球菌

M R S A 3 : O X , F L , K M , T C , E M 耐性黄色ブドウ球菌

M R S A 4 : O X , F L , K M , C P , C P L X 耐性黄色ブドウ球菌

E F 1 : 腸球菌

V R E : バンコマイシン耐性腸球菌

【 0 0 9 5 】

O X : オキサシリン、F L : フロモキエフ、K M : カナマイシン、

T C : テトラサイクリン、C P : クロラムフェニコール、E M : エリスロマイシン

C P L X : シプロフロキサシン

【 0 0 9 6 】

その結果、各ピーク物質の示す M I C 値自体は従来報告されている抗菌剤に比べると大きい値となっているものの、通常の菌とその多剤耐性菌 ( M S S A 1 と M R S A 3 , M R S A 4 との間、E F 1 と V R E 間 ) の比較においては、M I C 値はほとんど同等の値を示し、各ピーク物質の抗菌活性は多剤耐性の影響を受けていないことが確認された。

【 0 0 9 7 】

なお、本発明の環状ペプチド化合物の場合、抗菌活性と治療効果は必ずしも一致していないことが確認されている。例えば、M S S A に対する M I C 値が表 4 の場合で 6 . 3  $\mu$  g / m L、表 3 の場合で 5  $\mu$  g / m L を示した R H 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質は、後述

するマウス黄色ブドウ球菌感染モデルに対する治療効果 (ED<sub>50</sub> 値) の検討結果ではバンコマイシンの1/3程度のED<sub>50</sub> 値を示しており、高い治療効果を示すことが確認されている。

【0098】

MIC 値 5 μg/mL や 6 μg/mL は、バンコマイシンでは耐性菌の示す MIC 値とされている水準であるにもかかわらず、本発明の環状ペプチド化合物が十分な治療効果を示す理由の一つとして、本発明化合物が既存薬とは異なった作用機序で抗菌活性を示し、それが治療効果に反映している可能性が考えられる。既存薬と異なった作用機序で抗菌活性を示している場合は、少なくとも現時点での耐性菌の分離頻度が低いことが予測され、本発明の環状ペプチド化合物の有利な点と考えられる。

10

【0099】

試験例 3

< RH2180-5 Peak 5 物質のマウス黄色ブドウ球菌感染モデル (以下、「マウスモデル」と略記する。) における治療効果と毒性の検討 >

7% Δチン + 0.2 mM クエン酸鉄 (III) アンモニウム (Ferric ammonium citrate) に、黄色ブドウ球菌 Smith 株を懸濁し、6.2 × 10<sup>6</sup> 個 (20 × LD<sub>50</sub>) を一群 5 匹のマウス (ICR 雌 4 週齢) の腹腔に投与した。各薬剤は、以下に示す方法で先の菌株投与 2 時間後に皮下注射した。

【0100】

上記マウスモデルに対して、PBS に溶解した RH2180-5 Peak 5 物質を 25 mg/kg、12.5 mg/kg、6.3 mg/kg となるよう皮下注射し、投与後翌日の生存数を測定することでその治療効果 (ED<sub>50</sub> 値) を検討した (1 群 5 匹)。同様にしてバンコマイシンについても、今回用いたマウスモデルに対する ED<sub>50</sub> 値を検討した。RH2180-5 Peak 5 物質の場合、PBS 投与で生存なしとなる条件で、25 mg/kg の投与量でマウス全匹の生存が確認された。また、ED<sub>50</sub> 値はプロビット法により求めた。

20

【0101】

得られた結果を表 5 に示す。RH2180-5 Peak 5 物質はマウスモデルに対して治療効果を示し、その ED<sub>50</sub> 値は 0.6 mg/kg となり、同時に検討したバンコマイシンの ED<sub>50</sub> 値 1.6 mg/kg より明確に低く、黄色ブドウ球菌に対して治療効果の高い抗生物質となっていることが確認された。

30

【0102】

【表 5】

マウス黄色ブドウ球菌感染モデルにおける治療効果

サンプル	ED <sub>50</sub> (mg/Kg)
RH2180-5 peak5	0.6
バンコマイシン	1.6

40

*S. aureus* Smith 株 6.2 × 10<sup>6</sup> 個 (20 × LD<sub>50</sub>) をマウス (ICR ♀ 4 週齢) の腹腔に投与し、2 時間後に各薬剤を皮下注射した。

【0103】

また、RH2180-5 Peak 5 物質をマウスに皮下投与し、投与後翌日の観察によりマウスに対する RH2180-5 Peak 5 物質の急性毒性についても検討した。急性

50

毒性は、検討した中で最も高い濃度であるED<sub>50</sub>値の80倍量に相当する50mg/kgまでの投与量ではマウスはまったく殺傷されず、毒性を認めなかったことから、RH2180-5 Peak 5物質は低毒性であることが示唆された

【0104】

以上の結果から、RH2180-5の産生する本発明の抗生物質RH2180-5 Peak 5物質(P5)は、黄色ブドウ球菌に対して、バンコマイシンに比べて優れたED<sub>50</sub>値を示し、高い治療効果を示すと共に、MICによる抗菌活性の検討結果から臨床上非常に問題となっているMRSAだけでなく、今後MRSAと同様に問題化されることが予想されるVREに対しても有効性を示すという優れた特徴を有していることが確認できた。

10

【0105】

また、RH2180-5の培養物から単離精製された本発明の新規な環状ペプチド構造を基本骨格として有する新規な化合物9種中8種(ピーク1物質は抗菌スペクトルの検討未実施)は、共に多剤耐性菌とその同種の多剤耐性の性質を獲得していない菌株に対してほぼ同じMIC値を示した(表4)ことから、本発明の新規な環状ペプチド構造を基本骨格として有する新規な化合物は、特に多剤耐性菌に対して有効な感染症治療薬として用いられ得ることが確認できた。

【0106】

試験例4

< RH2180-5 Peak 5物質の抗菌スペクトルの検討 >

20

先のRH2180-5 Peak 5物質の、MRSA、VREを含む各種の微生物に対する抗菌スペクトルの検討を行った。10%血清を添加した場合と血清を添加しなかった場合それぞれのMIC値をCLSI(旧NCCLS米国臨床検査標準委員会)に基づく微量検体希釈法によって測定した。測定結果を表6に示す。

【0107】

## 【表6】

表6

Microorganisms	MIC (µg/ml)		
	Without serum	With 10% serum	
Methicillin susceptible <i>S. aureus</i> MSSA1(clinical isolate)	3.1	1.5	
Methicillin resistant <i>S. aureus</i> MRSA3(clinical isolate)	12.5	1.5	
Methicillin resistant <i>S. aureus</i> MRSA4(clinical isolate)	12.5	1.5	
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith ATCC 13709	6.25	1.5	10
<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	12.5	6.3	
Vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecalis</i> EF5	12.5	6.3	
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	25	ND	
<i>Bacillus subtilis</i> JCM2499	6.3	1.5	
<i>Bacillus cereus</i> JCM20037	3.1	0.8	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	6.3	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ND	25	
<i>Streptococcus sanguinis</i> JCM5678	ND	100	
<i>Streptococcus agalactiae</i> JCM5671	ND	100	20
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ND	50	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	7.8	3.9	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	7.8	15.6	
<i>Serratia marcescens</i> (clinical isolate)	>100	>50	
<i>Escherichia coli</i> W3110	>100	>100	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	>100	>50	
<i>Salmonella enterica</i>	>100	ND	
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	>100	>100	30
<i>Candida tropicalis</i> pK233	>100	>100	
<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	>100	>100	

ND: Not determined

## 【0108】

表6の結果より、RH2180-5 Peak 5物質は、グラム陽性菌に対し有効であり、血清の添加によって活性が上昇することが確認できた。

## 【0109】

## 試験例5

< RH2180-5 Peak 5物質の殺菌活性の検討 >

CA-Mueller Hinton Broth培地に $1.8 \times 10^8$ 個の黄色ブドウ球菌を摂取し、先のRH2180-5 Peak 5物質(25 µg/mL)、バンコマイシン(VM、5 µg/mL)、ゲンタマイシン(GM、2.5 µg/mL)を添加し、15分後、30分後、60分後、120分後の生存細胞数をCFU(colony forming unit/mL)として求めた。結果を表7に示す。

## 【0110】



【表 7】  
表 7

Time (minutes)	CFU/ml of <i>S. aureus</i>				
	RH2180-5 Peak5物質 (25µg/ml)	VM (5 µg/ml)	GM (2.5 µg/ml)	Control (no drug)	
0				1.8x10 <sup>8</sup>	10
15	<1x10 <sup>4</sup>	8.5x10 <sup>7</sup>	2.6x10 <sup>7</sup>		
30	<1x10 <sup>4</sup>	4.9x10 <sup>7</sup>	7.6x10 <sup>5</sup>		
60	<1x10 <sup>4</sup>	6.8x10 <sup>7</sup>	1.6x10 <sup>5</sup>		
120	<1x10 <sup>4</sup>	3.4x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>5</sup>		

\*VM: Vancomycin; GM: Gentamicin

20

【 0 1 1 1 】

表 7 の結果より、RH 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質を添加すると、バンコマイシン、ゲンタマイシンを添加した場合と比較して直ちに黄色ブドウ球菌が減少することが確認できた。

【 0 1 1 2 】

試験例 6

< RH 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質の溶菌活性の検討 >

CA - Mueller Hinton Broth 培地に黄色ブドウ球菌液を希釈し、RH 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質、バンコマイシン、ダプトマイシンを試験例 1 で用いたときの 5 倍の濃度で添加し、37 で培養した。吸光度計（島津製作所社製）を用いて、添加後の 6 0 0 n m における吸光度（OD<sub>600</sub>）を経時的に測定した。結果を図 1 1 に示す。

30

【 0 1 1 3 】

図 1 1 の結果より、RH 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質が、バンコマイシン、ダプトマイシンと比較して吸光度（OD<sub>600</sub>）の減少が大きかったことから、溶菌活性を示すことが確認できた。

【 0 1 1 4 】

実施例 3

< RH 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質の製剤化 >

< < 錠剤 > >

RH 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質 2 0 . 0 m g、ラクトース 4 0 m g、デンプン 2 0 m g、及び、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース 5 m g を均一に混合した後、ヒドロキシプロピルメチルセルロース 8 質量 % 水溶液を結合剤として湿式造粒法で打錠用顆粒を製造した、これに滑沢性を与えるのに必要なステアリン酸マグネシウムを 0 . 5 m g から 1 m g 加えてから打錠機を用いて打錠し、錠剤とした。

40

【 0 1 1 5 】

< < 液剤 > >

RH 2 1 8 0 - 5 P e a k 5 物質 1 0 . 0 m g を、2 質量 % 2 - ヒドロキシプロピル - サイクロデキストリン水溶液 1 0 m L に溶解し、注射用液剤とした。

【 0 1 1 6 】

50

## 検討例 3

## &lt; 16S rRNA 解析 &gt;

RH2180-5の16S rRNAの塩基をコロニーPCR法によって増幅し、増幅できたRNA断片についてシーケンサーによって解析した。その結果、5'末端側、3'末端側のいくつかの塩基を除く配列番号1に示すほぼ16S rRNA領域全長に相当する塩基配列を決定した。この塩基配列を元に、NCBIのBLASTを用いて既存のリソバクター属に属する菌株との相同性検索を行った。その結果RH2180-5は、既存の*Lysobacter enzymogenes* DSM 2043T株と99%の相同性を示したことから、RH2180-5はリソバクター(*Lysobacter*)属に属する微生物であると考えられた。

10

## 【0117】

## &lt; RH2180-5の新規性について &gt;

RH2180-5は、*Lysobacter enzymogenes* DSM 2043T株と化学的性質について相似する点が多いが、産生する生理活性物質の抗菌スペクトルが異なること、生理活性物質の本体である化合物がこれまで報告されていない新規な環状ペプチド構造を基本骨格とする「有用な薬理作用を有するRH2180-5 Peak 5物質とその関連化合物」である点で全く異なっている。この点は、既存の菌株との大きな相違点である。よって、以上の結果から、RH2180-5は、リソバクター(*Lysobacter*)属に属する新規な微生物であると判定した。

20

## 【産業上の利用可能性】

## 【0118】

本発明の新規な環状ペプチド化合物は、临床上大きな問題となっているMRSAやVRE等の多剤耐性菌に対して有効性を示すことから、新たな感染症治療薬として利用可能である。また、本発明の新規微生物株は、先の新規で有用な環状ペプチド化合物の製造に好適に利用することができる。

## 【受託番号】

## 【0119】

国内寄託：NITE P-870

ブダペスト条約に基づく寄託：NITE BP-870

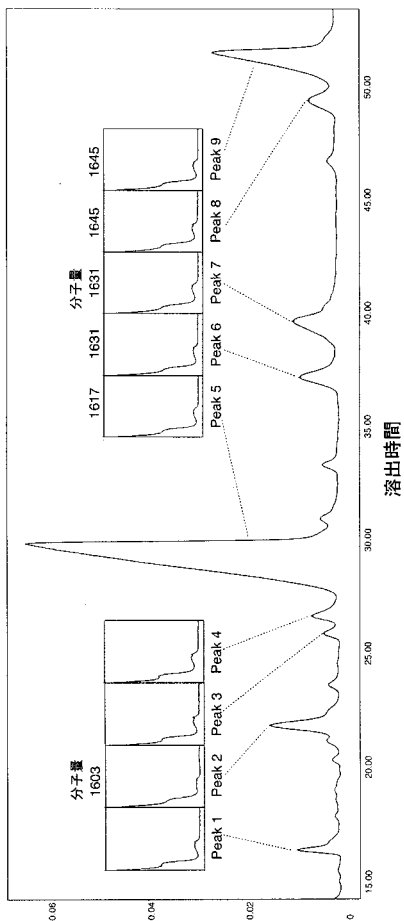
## 【配列表フリーテキスト】

30

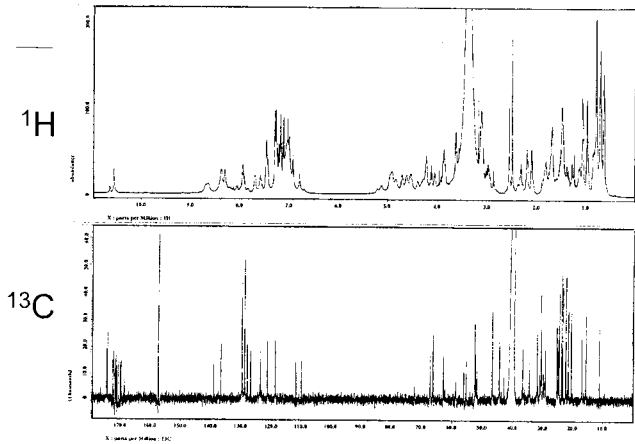
## 【0120】

配列番号1は、リソバクター(*Lysobacter*)属に属する未知の菌株の、16S rRNAのほぼ全長にあたる塩基配列である。

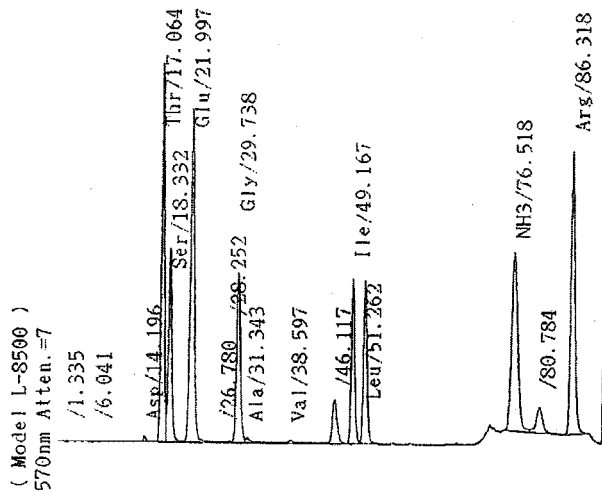
【 図 1 】



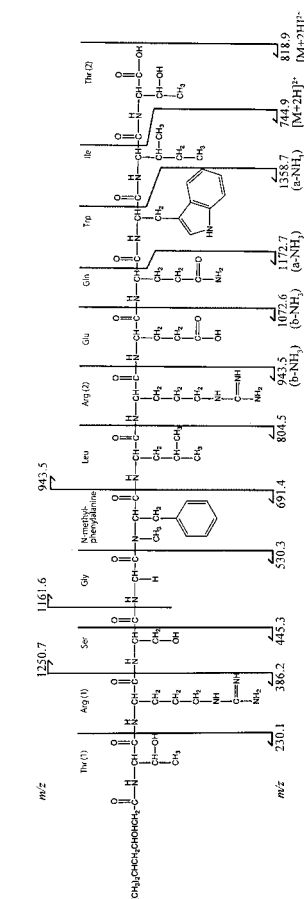
【 図 3 】



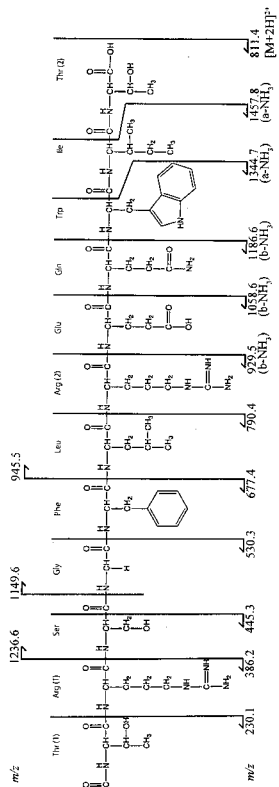
【 図 2 】



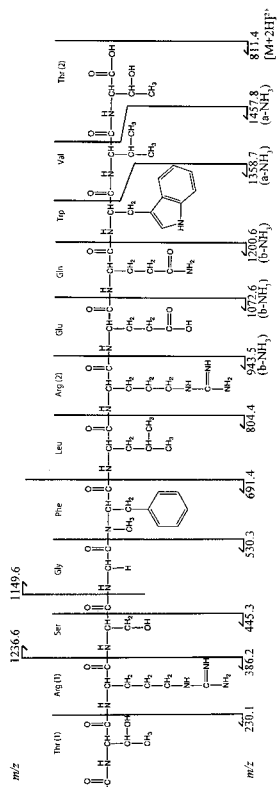
【 図 4 】



【 5 】

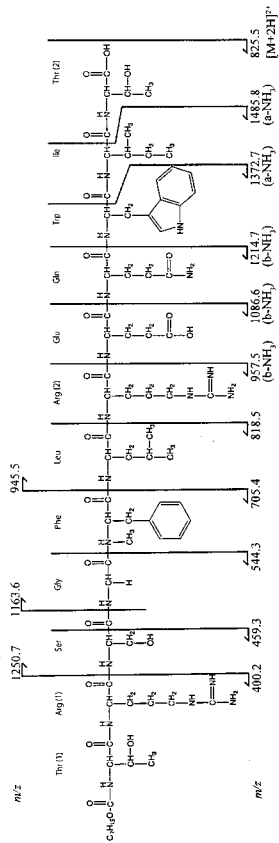


【 6 】



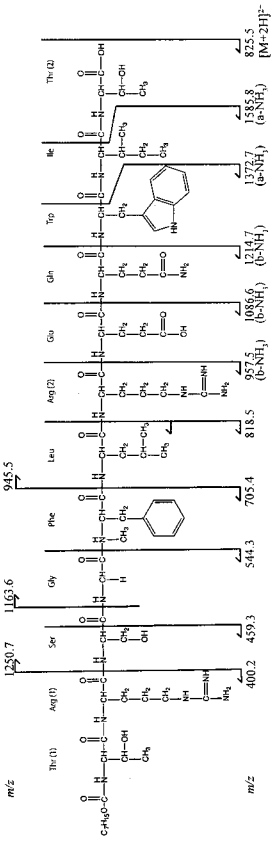
P1

【 7 】



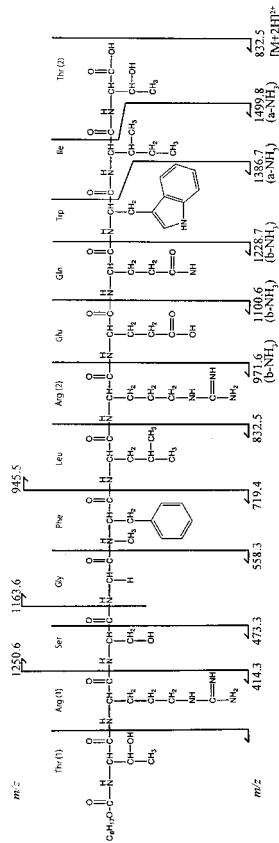
P2

【 8 】



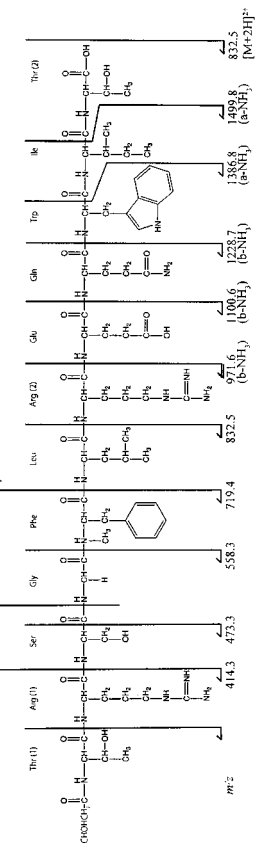
P3

【 9 】



P4

【 10 】



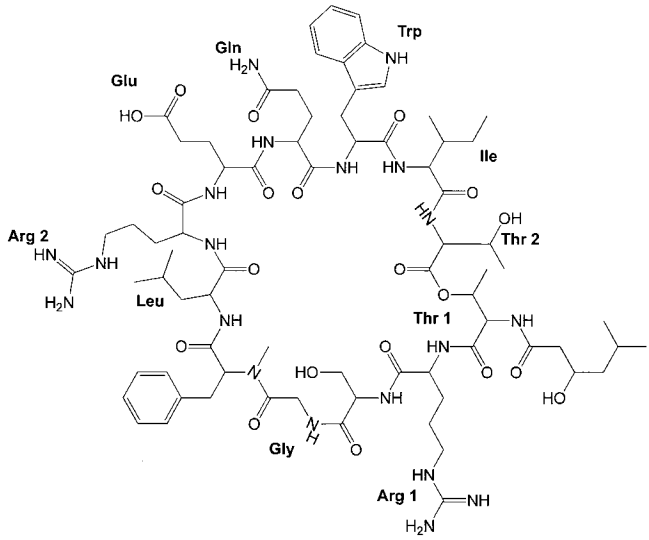
P6

P7

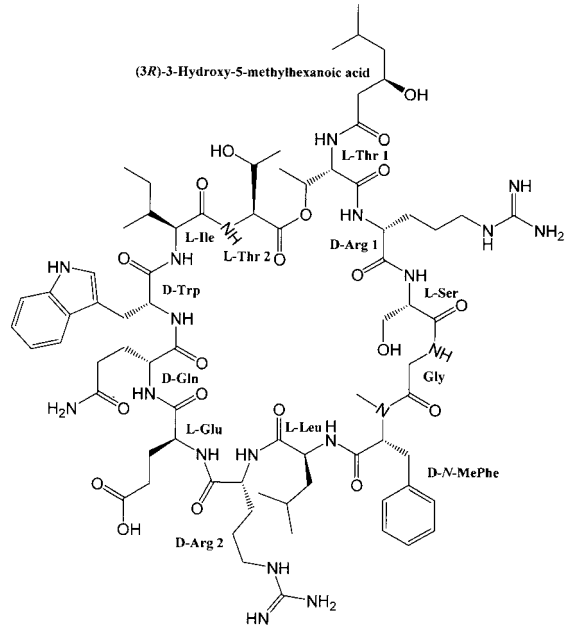
P8

P9

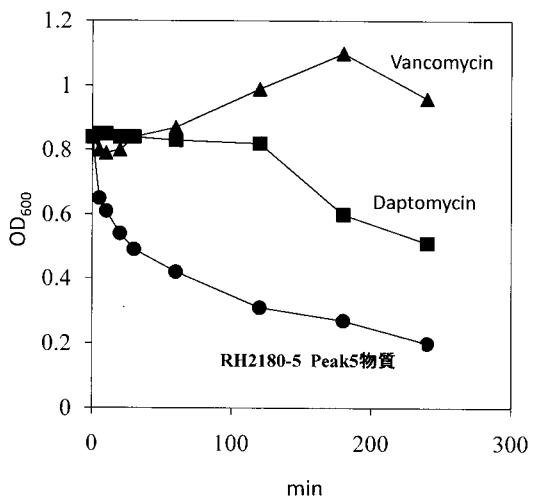
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【配列表】

2012006917000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 村上 和久

東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京大学アントレプレナープラザ402号室 株式会社ゲノム  
創薬研究所内

Fターム(参考) 4B064 AG37 CA02 DA02

4B065 AA01X AC14 BA22 CA24 CA44

4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 BA01 BA18 BA24 CA04 DA43 NA14

ZB351

4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 BA35 CA11 EA20 FA72 GA21 GA25