

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006 年 7 月 20 日 (20.07.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/075395 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 31/4355 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
C12P 17/18 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)  
C12N 1/20 (2006.01) C07D 491/048 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/000447
- (22) 国際出願日: 2005 年 1 月 11 日 (11.01.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 社団法人北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒108-8642 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): 供田 洋 (TOMODA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒182-0034 東京都調布市下石原 3-7-1 1-2 1 1 Tokyo (JP). 増間 碌郎 (MASUMA, Rokuro) [JP/JP]; 〒108-0073 東京都港区三田 4 丁目 7 番 1 3-1 0 2 号 Tokyo (JP). 大村 智 (OMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒157-0076 東京都世田谷区岡本 3 丁目 3 番 1 2 号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 和憲 (KOBAYASHI, Kazunori); 〒170-0004 東京都豊島区北大塚 2 丁目 2 5 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, 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:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title:  $\beta$ -LACTAM ANTIBIOTIC ACTIVITY ENHANCER AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称:  $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強剤及びその製造法

(57) Abstract: Penicillium citrinum FKI-1938 (FERM ABP-10165) that belongs to Penicillium citrinum and has an ability of producing FKI-1938A substance is cultured in a medium to accumulate FKI-1938A substance in the culture, and FKI-1938A substance that enhances the activity of  $\beta$ -lactam antibiotic is collected from the culture. Since the obtained substance has an action of enhancing the activity of imipenem, it has an effect on MRSA infections at a low concentration in a short time. Therefore, the occurrence frequency of resistant bacteria is reduced and effectiveness in overcoming the resistance is also expected.

(57) 要約: 本発明はペニシリウム シトリナムに属し、FKI-1938A 物質を生産する能力を有するペニシリウム シリナム (Penicillium citrinum) FKI-1938 (FERM ABP-10165) を培地に培養し、培養物中に FKI-1938A 物質を蓄積せしめ、該培養物から  $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性を増強せしめる FKI-1938A 物質を採取する。得られた物質はイムペネムの活性増強作用を有することから、MRSA 感染症に対して、低濃度、短時間で作用し、耐性菌出現頻度の低減を図り、耐性克服に対する有用性も期待される。

WO 2006/075395 A1

## 明細書

### $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強剤及びその製造法

#### 技術分野

本発明は、ヒトを含む動物のMRSA感染症の治療のための抗菌剤として利用されている $\beta$ -ラクタム抗生物質たとえばカルバペネム系のイミペネムと併用することによりその効果を増強せしめ得る $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強剤及びその製造法に関する。

#### 背景技術

近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、院内感染の主な原因菌として社会的問題となっている。この病原菌は、 $\beta$ -ラクタム抗生物質たとえばペナム系たとえばクロキサシリン、セフェム系たとえばセファゾリン、カルバペネム系たとえばイミペネム、パニペネム、メロペネム等に対する耐性を有している。一般に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染症の治療には、現時点ではほとんど耐性化が報告されていないグリコペプチド系のバンコマイシンやアミノグリコシド系のアルベカシンといった抗生物質が使用されている。またこの他に、 $\beta$ -ラクタム抗生物質同士、もしくは $\beta$ -ラクタム抗生物質と他の作用点の異なる抗生物質の併用療法が行われていた(長谷川裕美ら、抗菌薬投与の科学、264-273、1998年)。

バンコマイシンやアルベカシンについてもすでにこれらの薬剤に対する耐性菌が出現していることも報告されている。また、これらの薬剤については、第8脳神経障害による聴力障害などの副作用を有することが知られており、問題となっている(清水喜八郎(編)、抗菌集治療マニュアル、1993年)。

現在までに、このような状況に対処すべく、有効でなくなった $\beta$ -ラクタム

抗生物質の効力を回復させる作用を有する物質が報告されている。例えば、特表平9-509677号公報に開示されたヒトを含む動物のMRSA感染症の治療において同時に、別々にまたは連続的に使用するための組み合わせ製剤として、茶のエキスマたはその活性フラクションおよび $\beta$ -ラクタム抗生物質の組み合わせを含んでなる製品であって、前記製品が相乗的抗菌作用を生じる量の前記茶のエキスマたはその活性フラクションを含んでなる製品が提案された。

### 発明の開示

本発明者らは、抗菌剤とくにアゾール系抗真菌剤の活性増強作用を有する物質を探索するため、微生物の生産する代謝産物について種々の研究を続けた結果、新たに土壌から分離したペニシリウム シトリナム (*Penicillium citrinum*) に属するFKI-1938菌株が新規な化合物を生産することを見出した。この化合物はFKI-1938A物質及び／又はFKI-1938B物質及び／又はFKI-1938B'物質及び／又はFKI-1938C物質（総称してFKI-1938物質と命名）がアゾール系抗真菌剤の活性増強作用を有することを確認し、PCT/JP2004/016381として国際出願を行った。

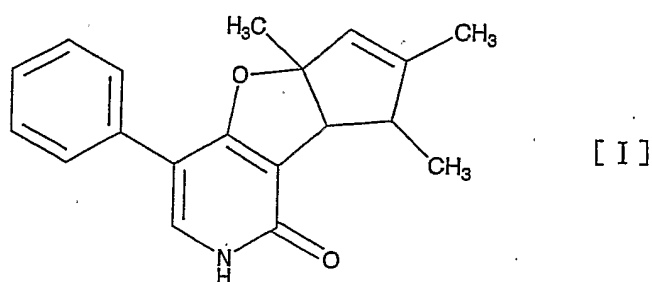
その後、本発明者らは更に該化合物における生物活性の探索を続けた結果、FKI-1938物質の内、意外にもFKI-1938A物質が $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性を増強する作用があることを見出した。 $\beta$ -ラクタム抗生物質とくにカルバペネム系のイミペネムの活性を増強する薬剤を提供することができればMRSA感染症に対する治療において有用であると考えられる。すなわち、 $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性を増強する薬剤は、 $\beta$ -ラクタム抗生物質の投与量を減量させ、投与期間を短縮させることになり耐性菌出現の頻度を低減させることが期待される。また同時に、作用の異なる2つの薬剤を併用することにより、 $\beta$ -ラクタム抗生物質に対する耐性を克服することも期待される。

かかる実情において、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）に対する

$\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強作用を有する増強剤を提供することは、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）をはじめとする $\beta$ -ラクタム抗生物質耐性を含む多剤耐性菌が原因で引き起こされる感染症の新しい治療法を提供し得るものであり、極めて有用なことである。

本発明は現在実用化されている抗菌剤の活性を増強する作用を有し、MRSA感染症に対して、低濃度、短期間で作用し、耐性菌の出現頻度を低減化することを可能にした、 $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強作用を有する増強剤及びその製造法を提供することを目的とするものである。

本発明は前述の知見に基づいて新たな生物活性が見出されたものであり、下記式〔I〕



で表されるFKI-1938A物質を用いることを特徴とする $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性を増強する活性増強剤を提供するものである。

本発明は $\beta$ -ラクタム抗生物質が、ペナム系、セフェム系、カルバペネム系から選ばれる活性増強剤を提供するものである。

本発明は前述の式〔I〕で表されるFKI-1938A物質が、 $\beta$ -ラクタム抗生物質と組み合わせられて、MRSAに対する相乗効果を有する $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性を増強する活性増強剤を提供するものである。

本発明はペニシリウム シトリナムに属し、前述の式〔I〕で表されるFKI-1938A物質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FKI-1938A物質を蓄積せしめ、該培養物から $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性を増強するFKI-1938A物質を採取する活性増強剤の製造法を提供する

ものである。

本発明は $\beta$ -ラクタム抗生物質が、ペナム系、セフェム系、カルバペネム系から選ばれる活性増強剤の製造法を提供するものである。

本発明はペニシリウム シトリナムに属し、前述の式 [I] で表される F K I - 1 9 3 8 A 物質を生産する能力を有するペニシリウム シトリナム (*Penicillium citrinum*) F K I - 1 9 3 8 (FERM ABP-10149) またはその変異株である  $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強作用を有する増強剤の製造法を提供するものである。

本発明はペニシリウム シトリナム (*Penicillium citrinum*) F K I - 1 9 3 8 (FERM ABP-10149) を提供するものである。

前記の式 [I] で表される  $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強作用を有する F K I - 1 9 3 8 A 物質を生産する能力を有する微生物（以下「F K I - 1 9 3 8 物質生産菌」と称する）は、ペニシリウム シトリナムに属するが、本発明の物質（ $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強剤）生産能を有するものであればよく、特に制限されることはない。本発明の F K I - 1 9 3 8 A 物質を生産するために使用される菌株の好適な一例としては、本発明者らによって沖縄県の土壌より新たに分離されたペニシリウム シトリナム (*Penicillium citrinum*) F K I - 1 9 3 8 株が挙げられる。

本菌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、ツァペック・イーストエキス寒天培地、25%グリセリン・硝酸塩寒天培地、麦芽汁寒天培地、三浦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。

ツァペック・イーストエキス寒天培地に生育したコロニーを顕微鏡で観察すると、菌糸は無色で隔壁を有していた。分生子柄（150～800×2.0～2

． 5  $\mu\text{m}$ ）は、気菌糸より直立して生じ、表面が滑面で、分岐することはなかった。分生子柄の先端にはメツラとフィアライドからなる二輪生のペニシルスを形成する。メツラは2～4本形成され、大きさは14～18×2.8～3.5  $\mu\text{m}$ であった。メツラの先端にアンプル型のフィアライドが5～8本形成され、大きさは8～11×2.0～3.0  $\mu\text{m}$ であった。フィアライドの先端からフィアロ型分生子が形成され、培養時間の経過とともに連鎖状となる。分生子は、球形から亜球形、青緑色、大きさ2.3～3.0  $\mu\text{m}$ で、表面は滑面であった。

## 2. 各種培地上での培養性状

本菌株を各種寒天培地上で、25℃、7日間培養した場合の肉眼的観察結果は下記の第1表に示すとおりであった。

第1表

培地	培地上の生育状態 (コロニーの直径)	コロニー表面 の色調	コロニー裏面 の色調	可溶性 色素
ツァベック・イーストエキス寒天培地				
	良好(30～36mm)	濃青緑色	薄黄褐色	なし
	羊毛状～ビロード状			
	しわ状			
	周辺平滑			
麦芽汁寒天培地				
	中程度(21～22mm)	濃オリーブ	薄黄褐色	なし
	ビロード状	緑色		
	周辺やや不規則			
25%グリセリン・硝酸塩寒天培地				

中程度（19～21mm） 濃青緑色 薄黄褐色 なし  
羊毛状～ビロード状  
しわ状  
周辺平滑

---

なお、本菌株はツァペック・イーストエクス寒天培地で、5℃および37℃で14日間培養したが、生育しなかった。

### 3. 生理的性状

#### 1) 最適生育条件

本菌株の最適生育条件はpH4～8、温度14.8～30.6℃である。

#### 2) 生育の範囲

本菌株の生育範囲はpH3～10、温度7.5～32.4℃である。

#### 3) 好気性、嫌気性の区別

好気性

### 4. 微生物の国際寄託

上記FKI-1938菌株の形態的特徴、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、本菌株はペニシリウム シトリナムに属する一菌株と同定し、ペニシリウム シトリナム (*Penicillium citrinum*) FKI-1938と命名した。本菌株は、ペニシリウム シトリナム FKI-1938 (*Penicillium citrinum* FKI-1938) として、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、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] に所在する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 Depositary National Instit

ute of Advanced Industrial Science and Technology) に寄託してある。受託日は平成16年(04)10月21日、受領番号FERM ABP-10149である。

本発明で使用するFKI-1938物質生産菌としては、前述のペニシリウム シトリナム FKI-1938菌株が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易く、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線照射または変異誘導剤、例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、2-アミノプリンなどを用いる人工的変異処理により取得できる人工的変異株は勿論、細胞融合株、遺伝子操作株、自然変異株も含め、ペニシリウム シトリナム (Penicillium citrinum) に属し、前記の式[I]で表されるFKI-1938A物質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。

本発明を実施するに当たっては、先ずペニシリウム シトリナムに属するFKI-1938物質生産菌を培地に培養することにより行われる。上記FKI-1938A物質の生産に適した栄養源としては、微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらに必要に応じて無機塩、ビタミン等を含有させた栄養培地が使用される。上記の同化し得る炭素源としては、グルコース、フラクトース、マルトース、ラクトース、ガラクトース、デキストリン、澱粉等の糖類、大豆油等の植物性油脂類が単独または組み合わせて用いられる。

消化し得る窒素源としては、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆粉、綿実粉、コーン・スティープ・リカー、麦芽エキス、カゼイン、アミノ酸、尿素、アンモニウム塩類、硝酸塩類が単独または組み合わせて用いられる。その他必要に応じてリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩などの塩類、鉄塩、マンガン塩、銅塩、コバルト塩、亜鉛塩等の重金属塩類やビタミン類、その他本FKI-1938A物質の生産に好適なものが適宜添加される。



培養するに当たり、発泡が激しいときには、必要に応じて液体パラフィン、動物油、植物油、シリコン等、界面活性剤等の消泡剤を添加してもよい。上記の培養は、上記栄養源を含有すれば、培地は液体でも固体でもよいが、通常は液体培地を用い、培養するのがよい。少量生産の場合にはフラスコを用いる培養が好適である。目的物質を大量に工業生産するには、他の発酵生産物と同様に、通気攪拌培養するのが好ましい。

培養を大きなタンクで行う場合は、生産工程において、菌の生育遅延を防止するため、はじめに比較的少量の培地に生産菌を接種培養した後、次に培養物を大きなタンクに移して、そこで生産培養するのが好ましい。この場合、前培養に使用する培地および生産培養に使用する培地の組成は、両者とも同一であってもよいし、必要があれば両者を変えてもよい。

培養を通気攪拌条件で行う場合は、例えばプロペラやその他機械による攪拌、ファメーターの回転または振とう、ポンプ処理、空気の吹き込み等、既知の方法が適宜使用される。通気用の空気は滅菌したものを使用する。

培養温度は、本 F K I - 1 9 3 8 物質生産菌が本 F K I - 1 9 3 8 A 物質を生産する範囲内で適宜変更し得るが、通常は 20 ~ 30 °C、好ましくは 27 °C 前後で培養するのがよい。培養 pH は通常 5 ~ 8、好ましくは 7 前後で培養するのがよい。培養時間は培養条件によっても異なるが、通常は 4 ~ 7 日程度である。

このようにして得られた本 F K I - 1 9 3 8 A 物質は、培養菌体および培養濾液に存在する。培養物から目的する F K I - 1 9 3 8 A 物質を採取するには、全培養物をアセトンなどの水混和性有機溶媒で抽出し、抽出液を減圧下有機溶媒で留去後、続いて残渣を酢酸エチル等の水不混和性有機溶媒で抽出することによって行われる。

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、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、あるいは繰り返すことにより、本 F K I - 1 9 3 8 A 物質を分離、精製

することができる。

#### 理化学的性状

本発明の F K I - 1 9 3 8 A 物質の理化学的性状は下記のとおりである。

- (1) 性状 : 白色結晶、
- (2) 分子量 : 293 (高速原子衝撃質量分析による)、
- (3) 分子式 :  $C_{19}H_{19}NO_2$ 、
- (4) 比旋光度  $[\alpha]_D^{25} = -1.6^\circ$  ( $c = 0.1$ 、メタノール)、
- (5) 紫外部吸収スペクトル: メタノール中で測定した紫外部吸収スペクトルは 205 nm ( $\epsilon = 9800$ )、246 nm ( $\epsilon = 10700$ ) 付近に特徴的な吸収極大を有する、
- (6) 赤外部吸収スペクトル: 臭化カリウム錠剤法で測定した赤外部吸収スペクトルは、2964、2859、1654、1604、1498、1430  $cm^{-1}$  に特徴的な吸収極大を有する、
- (7) プロトン核磁気共鳴スペクトル: Varian Japan 社製、核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトル (重クロロホルム中で測定) の化学シフト (ppm) は、3.26 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)、7.45 (1H, s)、7.52 (2H, m)、7.38 (2H, m)、7.29 (1H, m)、5.38 (1H, t,  $J = 1.5$  Hz)、2.90 (1H, dq,  $J = 2.0, 7.0$  Hz)、1.29 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz)、1.72 (3H, br. s)、1.65 (3H, s)、
- (8)  $^{13}C$  核磁気共鳴スペクトル: Varian Japan 社製、核磁気共鳴スペクトロメータを用いて測定した核磁気共鳴スペクトル (重クロロホルム中で測定) の化学シフト (ppm) は、104.1、56.4、113.5、162.4、133.8、111.7、165.2、133.2、127.5、128.5、127.3、126.2、150.5、49.0、20.2、14.7、26.2、
- (9) 溶剤に対する溶解性: メタノール、クロロホルム、酢酸エチルに可溶、

水、n-ヘキサンに不溶、

(10) 呈色反応：硫酸、リンモリブデン酸に陽性

(11) 酸性、中性、塩基性の区別：中性物質

以上、FKI-1938A物質の各種理化学的性状やスペクトルデータを詳細に検討した結果、本FKI-1938A物質は前述の式[I]で表される科学構造であることが決定された。

### 生物学的性状

本発明のFKI-1938A物質の生物学的性状は下記のとおりである。

(1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対するイミペネム活性増強作用

試験菌として、臨床分離されたメチシリン耐性 (*Staphylococcus aureus* K24株) を用いた。*Staphylococcus aureus* は、Mueller-Hinton broth (2.1% w/v) (DIFCO社) 37℃、20時間培養後、同培地で  $0.5 \text{ McFarland}$  (約  $10^8 \text{ CFU/mL}$ ) 相当に懸濁し、MHA培地 (Mueller-Hinton broth 2.1% (w/v)、Agar 1.5%) (1)、および同組成の培地にイミペネム (日本国、萬有製薬社、チェナム筋注用力価 0.5) を試験菌の生育に影響を与えない濃度、すなわち最終濃度  $10 \mu\text{g/mL}$  となるように添加した培地 (2) に植菌した。また以下、MHA培地 (1) にイミペネムを添加した培地をMHAIと表記する。植菌方法は米国臨床検査標準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS) 法に従い、滅菌綿棒 (日本国、川本産業社) にて各培地に塗抹した。試験菌に対する各培地上での抗菌活性は、ペーパーディスク法 (薄手、6mm: ADVANTECH社) にて、各化合物を  $10 \mu\text{g}$  含浸させ、37℃で20時間後の阻止円形の直径を単位mmで表記した。その結果は下記の第2表のとおりである。

第2表

---

FKI-1938A物質の阻止円形 (mm)

MHA (1)	—
MHA I (2)	18

---

(2) 微量液体希釈法による評価方法

微量液体希釈法によるイミペネム増強活性の評価は、日本化学療法学会標準法 (CHEMOTHERAPY 38巻、103～105頁、1990年) を一部改変して行った。

96 well plate (Corning社製、米国) の各wellに、Mueller-Hinton broth (2.1% w/v) を85  $\mu$ l 添加した後、あらかじめ滅菌水で段階希釈しておいたイミペネムを最終濃度  $4.8 \times 10^{-4}$  から256  $\mu$ g/ml となるように各wellに5  $\mu$ l 添加した。さらに、これら各wellに、FKI-1938A物質をそれ自身では生育に影響を与えない最終濃度15  $\mu$ g/ml または7.5  $\mu$ g/ml となるようにメタノール溶液5  $\mu$ l 添加した。よく混合した後、試験菌MRSAを上記同様に0.5 McFarland (約  $10^8$  CFU/ml) 相当に懸濁し、これを同培地で10倍に希釈した接種菌液を各wellに5  $\mu$ l 接種した。37℃、20時間培養後、菌の発育が肉眼的に認められないwellの中、最小の薬剤濃度をもってMICとした。その結果は下記の第3表のとおりである。

第3表

---

	<u>濃度</u>	<u>IPMのMIC (<math>\mu</math>g/ml)</u>
コントロール	—	32.0
FKI-1938A物質	15	0.5
FKI-1938A物質	7.5	1.0

---

### 発明を実施するための最良の形態

次に、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれのみに限定されるものでない。

#### 実施例

500ml容三角フラスコ2本にグルコース2.0%、イーストエキストラクト0.2%、ポリペプトン0.5%、硫酸マグネシウム7水和物0.05%、リン酸2水素カリウム0.1%、寒天0.1%（pH6.0に調製）を各100ml仕込み、綿栓後、蒸気滅菌した。これに寒天培地上に生育させたペニシリウムシトリナムFKI-1938菌株（*Penicillium citrinum* FKI-1938、FERM ABP-10149）を白金耳にて無菌的に接種し、27℃で72時間振とう培養し、それを種培養液とした。

次にグリセロール2.0%、シュクロース1.0%、アンモニウムアセテート0.5%、リン酸2水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム7水和物0.05%、塩化カリウム0.05%、カルチベータ1000.2%、寒天0.1%（pH6.0に調製）を7.5L容ジャー（日本国、丸菱バイオエンス社製）に5L仕込み、蒸気滅菌後、種培養した培養液50mlを無菌的に移植し、27℃で7日間培養した。得られた全培養液に5Lのアセトンを加え良く攪拌し、減圧濃縮し、これを酢酸エチルで抽出後、減圧濃縮して粗物質2.9gを得た。

次にこの粗物質2.9gをシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーにチャージし、クロロホルムとメタノールで溶出するカラムクロマトグラフィーを行った。クロロホルム：メタノール＝75：1で溶出するフラクションを減圧乾固し粗物質87.6mg得た。次にこの87.6mgの粗物質を高速液体クロマトグラフィーにより分離精製した。装置はSSC3461（日本国、センシュウ科学社製）を用い、カラムはPEGASIL-ODS（ODS系樹脂、センシュウ科学社製、日本国）を用い、溶媒系は0.05%リン酸含有の40分間のアセトニトリル30%から70%のグラジエントを用い、検出はUV210nm、流速1.0ml/分で行った。32.0分に溶出したフラクションのアセチニトリ

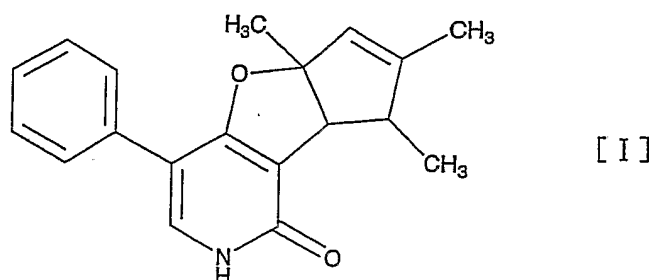
ルを除去し、得られた水層を酢酸エチル抽出を行い、減圧乾固してF K I - 1 9 3 8 A物質を6.4mg単離した。

#### 産業上の利用分野

以上のことから、本発明によるF K I - 1 9 3 8 A物質は $\beta$ -ラクタム抗生物質とくにイムペネムの活性増強作用を有する。したがって、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MR S A)に対するイミペネム活性増強作用を有する増強剤を提供することができ、それはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MR S A)をはじめとする $\beta$ -ラクタム抗生物質耐性を含む多剤耐性菌が原因で引き起こされる感染症に対して、低濃度、短期間で作用し、耐性菌出現頻度を低減せしめ得る有用な医薬品が得られる。

## 請 求 の 範 囲

## 1. 下記式 [I]



で表される F K I - 1 9 3 8 A 物質が  $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強作用を有する活性増強剤。

2.  $\beta$ -ラクタム抗生物質が、ペナム系、セフェム系、カルバペネム系から選ばれる請求の範囲 1 記載の活性増強剤。

3. 請求の範囲 1 に記載の式 [I] で表される F K I - 1 9 3 8 A 物質が、 $\beta$ -ラクタム抗生物質と組み合わせられて、MRSA に対する相乗効果を有することからなる請求の範囲 1 記載の活性増強剤。

4. ペニシリウム シトリナム (*Penicillium citrinum*) に属し、請求の範囲 1 記載の式 [I] で表される F K I - 1 9 3 8 A 物質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 F K I - 1 9 3 8 A 物質を蓄積せしめ、該培養物から  $\beta$ -ラクタム抗生物質の活性増強作用を有する F K I - 1 9 3 8 A 物質を採取することを特徴とする活性増強剤の製造法。

5.  $\beta$ -ラクタム抗生物質が、ペナム系、セフェム系、カルバペネム系から選ばれる請求の範囲 4 記載の活性増強剤の製造法。

6. ペニシリウム シトリナムに属し、請求の範囲 1 記載の式 [I] で表される F K I - 1 9 3 8 A 物質を生産する能力を有する微生物がペニシリウム シトリナム (*Penicillium citrinum*) F K I - 1 9 3 8 (

FERM ABP-10149) またはその変異株である請求の範囲4記載の活性増強剤の製造法。

7. ペニシリウム シトリナム (Penicillium citrinum) FKI-1938 (FERM ABP-10149)。



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000447

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. <sup>7</sup> A61K31/4355, C12P17/18, C12N1/20, A61P31/04, A61P43/00//C07D491/048  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) Int.Cl. <sup>7</sup> A61K31/4355, C12P17/18, C12N1/20, C07D491/048  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (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	WO 98/17625 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 30 April, 1998 (30.04.98), Full text & AU 9747221 A	1-7
A	JP 9-501702 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 18 February, 1997 (18.02.97), Full text & WO 59/30417 A	1-7
A	JP 9-509677 A (ROYAL FREE HOSPITAL SCHOOL OF MEDICINE), 30 September, 1997 (30.09.97), Full text & WO 95/23607 A	1-7
<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 01 February, 2005 (01.02.05)		Date of mailing of the international search report 22 February, 2005 (22.02.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int cl7 A61K31/4355 C12P17/18 C12N1/20 A61P31/04 A61P43/00 // C07D491/048		
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 cl7 A61K31/4355 C12P17/18 C12N1/20 C07D491/048		
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		
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 (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (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 請求の範囲の番号
A	WO 98/17625 A (第一製薬株式会社) 1998. 04. 30, 文献全体 & AU 9747221 A	1-7
A	JP 9-501702 A (旭化成工業株式会社) 1997. 02. 18, 文献全体 & WO 95/30417 A	1-7
A	JP 9-509677 A (ロイヤル フリー ホスピタル スクール オブ メディシン) 1997. 09. 30, 文献全体 & WO 95/23607 A	1-7
<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 の日の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	01. 02. 2005	国際調査報告の発送日
		22. 2. 2005
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4 B
日本国特許庁 (ISA/JP)	内藤 伸一	8615
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3448
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		