

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5583882号
(P5583882)

(45) 発行日 平成26年9月3日 (2014.9.3)

(24) 登録日 平成26年7月25日 (2014.7.25)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 J 17/00 (2006.01)

A 2 3 L 1/30 (2006.01)

A 6 1 K 31/58 (2006.01)

A 6 1 K 31/7048 (2006.01)

A 6 1 K 36/48 (2006.01)

C O 7 J 17/00

A 2 3 L 1/30

A 6 1 K 31/58

A 6 1 K 31/7048

A 6 1 K 35/78

B

Z N A

J

請求項の数 4 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-517617 (P2006-517617)
 (86) (22) 出願日 平成16年6月23日 (2004.6.23)
 (65) 公表番号 特表2007-524627 (P2007-524627A)
 (43) 公表日 平成19年8月30日 (2007.8.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/020277
 (87) 国際公開番号 W02005/000245
 (87) 国際公開日 平成17年1月6日 (2005.1.6)
 審査請求日 平成19年3月30日 (2007.3.30)
 審判番号 不服2011-20743 (P2011-20743/J1)
 審判請求日 平成23年9月26日 (2011.9.26)
 (31) 優先権主張番号 60/480, 988
 (32) 優先日 平成15年6月23日 (2003.6.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513320909
 テロメラゼ アクティベーション サイ
 エンシーズ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1017
 O, ニューヨーク, レキシントン ア
 ベニュー 420, スイート 2900
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

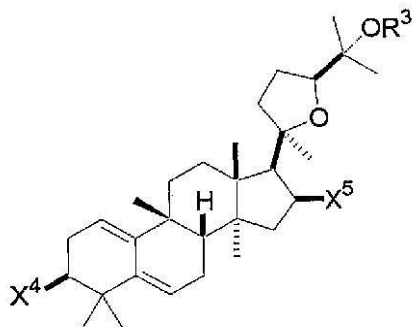
(54) 【発明の名称】 テロメラゼ活性を増大させるための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I I :

【化 1 6】



II

の化合物であって、

式中、

X⁴ および X⁵ の各々が、ヒドロキシ、C₁ ~ C₆ アルコキシ、C₁ ~ C₆ アシルオキシ、ケト、およびグリコシドから独立して選択され、

OR³ が、ヒドロキシ、C₁ ~ C₆ アルコキシ、C₁ ~ C₆ アシルオキシ、およびグリ

コシドから選択され、

前記グリコシド上の任意のヒドロキシル基が、さらにグリコシド、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、または $C_1 \sim C_6$ アシルにより置換され得る、化合物。

【請求項 2】

X^4 および OR^3 の各々が、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ アシルオキシ、およびグリコシドから選択され、 X^5 が、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ アシルオキシ、およびケト ($=O$) から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

X^4 が、OH またはグリコシドであり、 X^5 および OR^3 の各々が、OH である、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 4】

X^4 が、OH である、請求項 3 に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、細胞内のテロメラーゼ活性を誘導する方法および組成物に関する。

【0002】

(発明の背景および参考文献)

(テロメラーゼ)

20

テロメラーゼは、テロメアの両端へのテロメア反復付加を触媒するリボ核蛋白質である。テロメアは、染色体の両端をキャップする反復配列の長い延伸体であり、染色体を安定化させると考えられている。ヒトにおいて、テロメアは、典型的に 7 ~ 10 kb の長さであり、-TTAGGG- の複数反復配列から成っている。テロメラーゼは、成人細胞の多くにおいて発現されず、テロメアの長さは、度重なる複製に伴って短くなる。ある一定の複製回数の後に、テロメアの累進的短縮により、細胞はテロメアの危機段階に入り、次いでそれが細胞の老化へと至る。一定の疾患は、早発性細胞老化をもたらす急速なテロメア損失に関連している。ヒト細胞におけるヒトテロメラーゼ蛋白質をコードする遺伝子発現により、恐らく細胞の生来の老化経路を迂回することによる不死表現型が与えられることが示されている。さらに、短いテロメアを有する老化細胞において、テロメラーゼ遺伝子の発現により、テロメアの長さの増加および幼若細胞に典型的に関連した表現型の回復が生じることが示されている。

30

【0003】

腫瘍細胞および一定の幹細胞とはコントロール的に、体細胞は、テロメラーゼ活性を僅かしか持たないか、または全く持たず、少なくとも幾つかの染色体のテロメア両端が、危機的な長さまで短縮すると、分裂を停止し、プログラム化された細胞老化 (細胞死) へと至る。老化に至りつつある体細胞におけるテロメア反復の損失が、低テロメラーゼ活性により増加するため、テロメア反復の配列をテロメアに付加する作用を有するテロメラーゼ活性の誘導により、死ぬべき運命にある体細胞に複製能力の増強が提供され、老化細胞が、損傷組織の修復時に増殖し、適切に細胞周期から抜け出る能力が与えられる。

40

【0004】

体細胞におけるテロメラーゼ活性増大の治療的利益になる可能性のあるものとしては、例えば、感染した CD4⁺ 細胞を殺す働きを担っている細胞毒性 T リンパ球 (CD8⁺ 細胞) の早期老化を特徴とする AIDS の治療 (例えば、Dagarragら、2003 年を参照) ; アルツハイマー病における神経保護 (例えば、Mattson、2000 年を参照) ; 創傷治療および副腎皮質細胞 (例えば、Thomasら、2000 年を参照) または骨髄細胞または間質性 / 間充織移植片細胞 (例えば、Simonsenら、2002 年を参照) などの外移植片細胞の維持が挙げられる。これらの文献の完全な引用は下記に刊行されている。

【0005】

50

テロメラーゼのこれら、ならびに他の特徴を検討している文献としては、以下のものが挙げられる：

Allsopp, R. C. ら、「Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo」、Exp. Cell Res. 220 (1) : p. 194 - 200 (1995年9月)；

Allsopp, R. C. ら、「Telomerase is required to show telomere shortening and extend replicative lifespan of HSC during serial transplantation」、Blood (e-publication) 2003年3月27日；

Bodnar, A. G. ら、「Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells」、Science 279 (5349) : p. 349 - 52 (1998年1月16日)；

Cech, T. R. ら、米国特許第6,093,809号(2000年7月25日)；

Cech, T. R. ら、米国特許第6,166,178号(2000年12月26日)；

Cech, T. R. ら、米国特許第6,261,836号(2001年7月)；

Chiu, C. P. ら、「Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase」Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 214 (2) : p. 99 - 106 (1997年2月)；

Dagarag, M. ら、「Differential impairment of lytic and cytokine functions in senescent human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes」、J. Virol. 77 (5) : p. 3077 - 83 (2003年3月)；

Farwell, D. G. ら、「Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase」、American Journal of Pathology 156 (5) : p. 1537 - 47 (2000年5月)。

Fujimoto, R. ら、「Expression of telomerase components in oral keratinocytes and squamous cell carcinomas」、Oral Oncology 37 (2) : p. 132 - 40 (2001年2月)；

Funk, Walter D. ら、「Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model」、Experimental Cell Research 258 (2) : p. 270 - 278 (2000年8月1日)；

Hannon, G. J. および Beach, D. H.、「Increasing proliferative capacity and preventing replicative senescence by increasing telomerase activity and inhibiting pathways inhibiting cell proliferation」、PCT国際出願公開第2000/031238 (2000年6月)；

Hannon, G. J. ら、「Extension of cellular lifespan using telomerase-activating therapeutic agents」、PCT国際出願公開第99/35243 (1999年7月

10

20

30

40

50

);

Harley, B. A., «Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes», Proc Natl Acad Sci USA 93(13): p. 6476-81 (1996年6月25日);

Harley, C. B., «Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts», Nature 345(6274): p. 458-60 (1990年5月31日);

Harley, C. B., «Telomerase, cell immortality, and cancer», Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59: p. 307-15 (1994);

Harley, C. B., «Telomeres and telomerase in aging and cancer», Curr. Opin. Genet. Dev. 5(2): p. 249-55 (1995年4月);

Harley, C. B., «Telomerase and cancer», Important Adv. Oncol. p. 57-67 (1996);

Harley, C. B., «Human aging and telomeres», Ciba Found. Symp. 211: p. 129-39 (1997);

Harley, C. B., «Telomerase is not an oncogene», Oncogene 21: p. 494-502 (2002);

Henderson, S., «In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell transformation», J. Cell Biol. 134(1): p. 1-12 (1996年7月);

Jiang, X. R., PCT国際出願公開第02/91999号;

Jiang, X. R., «Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype», Nature Genetics 21(1): p. 111-4 (1999年1月);

Kang, M. K., «Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres», Cell Growth & Differentiation 9(1): p. 85-95 (1998年1月);

Kim, N. W., «Telomerase activity assays», 米国特許第5,629,154号 (1997年5月);

Lee, K. M., «Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas», Biochem Biophys Res Commun 301(4): p. 1038-44 (2003年2月21日);

Ludwig, A., «Ribozyme cleavage of telomerase mRNA sensitizes breast epithelial cells to inhibitors of topoisomerase», Cancer Res., 61: p. 3053-3061 (2001);

Mattson, M. P., «Emerging neuroprotective strategies for Alzheimer's disease: dietary

10

20

30

40

50

ry restriction, telomerase activation, and stem cell therapy」、Exp Gerontol. 35(4): p. 489 - 502 (2000年7月) ;

Morales, C. P. ら、「Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase」、Nature Genetics 21(1): p. 115 - 8 (1999年1月) ;

Oh, H. および Schneider, M. D.、「The emerging role of telomerase in cardiac muscle cell growth and survival」、J Mol Cell Cardiol 34(7): p. 717 - 24 (2002年7月) ;

Simonsen, J. L. ら、「Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells」、Nat Biotechnol 20(6): p. 592 - 6 (2002年6月) ;

Thomas, M.、Yang, L. および Hornsby, P. J. 「Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase」、Nat Biotechnol 18(1): p. 39 - 42 (2000年1月) ;

Vasa, M. ら、「Nitric oxides activates telomerase and delays endothelial cell senescence」、Circ. Res. 87(7): p. 540 - 542 (2000) ;

Villeponteau, B. ら、米国特許第5,583,016号(1996年12月) ;

West, M. D. ら、「Methods of screening for compounds that derepress or increase telomerase activity」、米国特許第6,007,989号(1999年12月) ;

White, M. A. 「Assembly of telomerase components and chaperonins and methods and compositions for inhibiting or stimulating telomerase assembly」、PCT国際出願公開第2000/08135号(2000年2月) ;

Yang, J. ら、「Telomerized human microvasculature is functional in vivo」、Nature Biotechnology (米国) 19(3): p. 219 - 24 (2001年3月) ;

Yang, J. ら、「Human endothelial cell life extension by telomerase expression」、J. Biol. Chem. 274(37): P. 26141 - 8 (1999年9月10日) ;

Yudoh, K. ら、「Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shorting and replicative senescence in human osteoblasts」、J. Bone and Mineral Res. 16(8): p. 1453 - 1464 (2001)。

【0006】

テロメラーゼ活性を治療的に増大させる方法は、例えば、上記に全て引用した Bodnar (1997)、White (2000)、Hannon ら (1999; 2000)、

10

20

30

40

50

Franzeseら(2001)、およびYudohら(2001)によって研究されている。これらの報告において、テロメラーゼ活性は、一般にヒトのテロメラーゼの蛋白質成分をコードする遺伝子、hTERTの過剰発現により、またはテロメラーゼの組立てを媒介する蛋白質、例えば、熱ショック蛋白質(White)の発現により増大させられる。Franzeseらは、HIV感染の治療に処方されるプロテアーゼ阻害剤であるサキナビルが、末梢血の単核細胞におけるテロメラーゼ活性を増大させると報告しており；Vasaraは、一酸化窒素(NO)前駆体の投与により、テロメラーゼの活性化とそれにより生じる内皮老化の遅れを記載している。

【0007】

(アストラガロシド類およびギンセノシド類)

10

アストラガロシドファミリーおよびギンセノシドファミリーの化合物は、種々の生物学的作用を有していることが報告されている。アストラガロシド類およびギンセノシド類の生物学的活性を検討している文献としては、以下のものが挙げられる：

Bedir, E.ら、「Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species」、*Biol & Pharm Bull* 23(7): p. 834-7 (2000)；

Binder, B.ら、「Use of triterpensaponins, such as notoginsenoside R1 (NR1) and/or astragaloside (ASIV) for preparing medicaments」、米国特許第5,770,578号(1998年6月)；

20

Calzada, L.ら、「Effect of tetracyclic triterpenes (argentains A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumors of human breast」、*Medical Science Research* 23(12): p. 815-16 (1995)；

Chen, X.ら、「Protective effect of ginsenoside Rg1 on dopamin-induced apoptosis in PC12 cells」、*Acta Pharmacol Sinica* 22(8): p. 673-678 (2001)；

30

Hashimoto, K.ら、「Skin tissue regeneration promoters comprising ginsenoside Rb1」、国際公開第200192289号(2001)；欧州特許出願公開第1295893号(2003)；

Hong, H.-Y.ら、「Stimulatory effects of ginsenoside-Rg₁ on p56^{lck} kinase and cell proliferation in Jurkat T cells」、*Korean J. Ginseng Sci.* 19(2): p. 117-21 (1995)；

Huang, Y.ら、「Selected non-timber forest products with medicinal applications from Jilin Province in China」、会議標題：Forest communities in the third millennium: Linking research, business, and policy toward a sustainable non-timber forest products sector；カナダ国オンタリオ州ケノラ、1999年10月1～4日；General Technical Report-North Central Research Station, USDA Forest Service (No. NC-217): p. 93-101 (2000)；

40

Kaneko, M.ら、「Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leukopenia in mi

50

ce administered a Japanese ethical herbal drug, Hochu-ekki-to, Immunopharmacology 44(3): p. 223 - 231 (1999);

Kinjo, J. 氏、*「Anti-herpes virus activity of fabaceous triterpenoidal saponins」*、Biological & Pharmaceutical Bulletin 23(7): p. 887 - 9 (2000年7月);

Khushbaktova, Z. A. 氏、*「Influence of cycloartanes from plants of the genus Astragalus and their synthetic analogs on the contractive function of the rnyocarbium and the activity of Na, K - ATPase」*、Chem. Nat. Compounds 30(4): p. 469 - 473 (1994);

Lee, Y. J. 氏、*「Ginsenoside - Rg1, one of the major active molecules from Panax ginseng, is a functional ligand of glucocorticoid receptor」*、Mol Cell Endocrinol 133(2): p. 135 - 40 (1997年10月);

Liu, P. 氏、*「Effect of ginsenosides Rb1, Rg1, Rh1 and Re on proliferation of cells in vitro」*、Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa 8(4): p. 36 - 41 (1996); CA Abstract No. 1997: 400846;

Oda, K. 氏、*「Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants」*、Biol. Chem. 381(1): p. 67 - 74 (2000);

Pistelli, L. 氏、*「Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from Astragalus verrucosus」*、Fitoterapia 73(4): p. 336 - 339 (2002);

Prince, R. L. および Min. X.、*「Compositions and method for treating or preventing osteoporosis」*、PCT国際公開第2002/01996号;

Sengupta, S. 氏、*「Pharmaceutically effective compounds and their use」*、PCT国際公開第2002/69980号および国際公開第2001/07732号;

Wang, S. 氏、*「Promoting effect of ginsenoside Re on the proliferation of murine bone marrow cells」*、Baiqiuen Yike Daxue Xuebao 23(2): p. 141 - 142 (1997); CA Abstract No. 1997: 570234;

Wang, Y - P. 氏、*「Effect of astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice」*、Acta Pharmacologica Sinica 23(3): p. 263 - 6 (2002年3月);

Yasukawa, K. 氏、*「Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and*

10

20

30

40

50

betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis」、Oncology 48(1): p. 72 - 6 (1991) ;

Yamamoto, M. 5、 「The stimulatory effects of ginseng saponins on proliferation and DNA synthesis of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts in relation to cytokines or growth factors」、Nissei Byoin Igaku Zasshi 24(1): p. 12 - 13 (1996) ;

10

Zhang W. J. 5、 「Regulation of the fibrinolytic potential of cultured human umbilical vein endothelial cells: astragaloside IV downregulates plasminogen activator inhibitor - 1 and upregulates tissue - type plasminogen activator expression」、Journal of Vascular Research 34(4): p. 273 - 80 (1997年7月～8月) ;

Zi - Pu, L. および Qian, C.、 「Effects of astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats」、Acta Pharmacol Sin 23(10): p. 898 - 904 (2002年10月)。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

本明細書に記載されている本発明は、細胞におけるテロメラーゼ活性を増大させる方法およびこのような方法に用いられる組成物に関する。このような方法および組成物は、細胞培養、すなわちインビトロまたはエキソビボにおける細胞、またはヒト対象および非ヒト動物、特に非ヒト動物などの対象の組織において増殖している細胞などのインビボ細胞に使用できる。

30

【0009】

特定の実施例において、該組成物は、下記の式Ⅰ、ⅡまたはⅢの化合物を含んでなる。本発明の態様は、化粧品、栄養剤および薬剤の適用、特に細胞内のテロメラーゼ活性増大が有益であることが示されているか、または有益であると考えられている場合の適用における使用のための、このような化合物の処方物を含む。細胞または組織内のテロメラーゼ活性を増大させる必要性、またはその利益が判断された後で、このような処方物を適用または投与するための方法を含む、このような適用のための化合物またはそれらの処方物の使用法もまた提供される。

40

【0010】

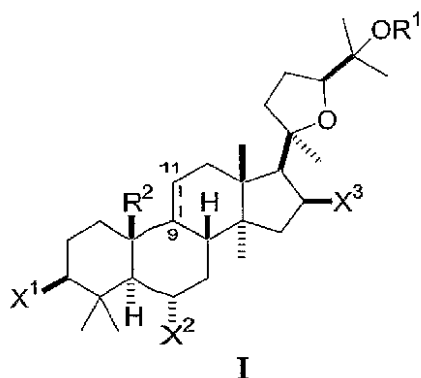
本発明は、一態様において、細胞または組織内のテロメラーゼ活性を増大させる方法を含む。該方法は、細胞または組織を、下記の式Ⅰ、式Ⅱまたは式Ⅲの単離化合物の処方物と接触させることを含んでなる。好ましい実施形態において、該化合物は、下記の式Ⅰまたは式Ⅱの化合物である。さらに該方法は、テロメラーゼ活性の増大が望まれる細胞または組織を同定する予備工程を含んでなる。

【0011】

式Ⅰ：

【0012】

【化 17】



10

の化合物において、

X^1 、 X^2 、および X^3 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケト、およびグリコシドから独立して選択され；

OR^1 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択され；

前記グリコシド上の任意のヒドロキシル基は、前記化合物が最大3つのグリコシドを含むように、さらにグリコシド、低級アルキル、または低級アシルにより置換され得；

R^2 は、メチルであり、以下：

20

【0013】

【化 18】

は、9位の炭素と11位の炭素との間の二重結合を表すか；または好ましい実施形態において、 R^2 は、9位の炭素と一緒になって縮合シクロプロピル環を形成し、以下：

【0014】

【化 19】

30

は、9位の炭素と11位の炭素との間の単結合を表す。

【0015】

好ましくは、該化合物は、ゼロ、1つまたは2つ、より好ましくはゼロまたは2つのグリコシドを含み、該グリコシドのいずれもさらなるグリコシドで置換されない。グリコシドは、D（天然の）立体配置のものであることが好ましい。

【0016】

式Iの選択された実施形態において、 X^1 および X^2 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから独立して選択され、 X^3 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケト、およびグリコシドから選択される。さらなる実施形態において、 X^1 は、OHまたはグリコシドであり、 X^2 および OR^1 の各々は、独立してOHまたはグリコシドであり、 X^3 は、OHまたはケトである。式Iの例示的化合物としては、アストラガロシドIV、シクロアストラゲノール、アストラゲノール、アストラガロシドIV 16-オン、シクロアストラゲノール6-D-グルコピラノシド、およびシクロアストラゲノール3-D-キシロピラノシドが挙げられる。選択された実施形態において、該化合物は、アストラガロシドIV、シクロアストラゲノール、アストラゲノールおよびアストラガロシドIV 16-オンから選択される。一実施形態において、該化合物は、アストラガロシドIVである。

40

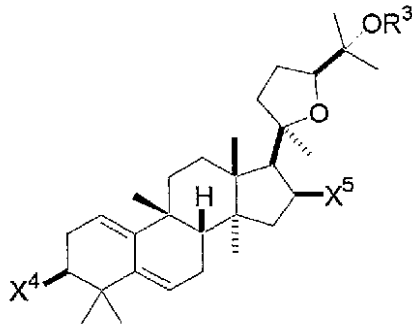
【0017】

式II：

【0018】

50

【化 2 0】



II

10

の化合物において、

X^4 および X^5 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケト、およびグリコシドから独立して選択され、

OR^3 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択され、

前記グリコシド上の任意のヒドロキシル基は、該化合物が最大3つのグリコシドを含むように、さらにグリコシド、低級アルキル、または低級アシルにより置換され得る。

【0019】

20

好ましくは、該化合物は、ゼロ、1つ、または2つ、より好ましくはゼロまたは2つのグリコシドを含み、該グリコシドのいずれもさらなるグリコシドで置換されないD立体配置のものであることが好ましい。

【0020】

式IIの選択された実施形態において、 X^4 および OR^3 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択され、 X^5 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびケト(=O)から選択される。さらなる実施形態において、 X^4 は、OHまたはグリコシドであり、 X^5 および OR^3 の各々は、OHである。一実施形態において X^4 は、OHである。

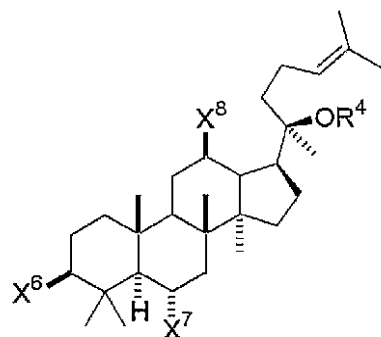
【0021】

30

式III:

【0022】

【化 2 1】



III

40

の化合物において、

X^6 、 X^7 、および X^8 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケトおよびグリコシドから独立して選択され；

OR^4 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択され；

前記グリコシド上の任意のヒドロキシル基は、前記化合物が最大3つのグリコシドを含

50

むように、さらにグリコシド、低級アルキル、または低級アシルにより置換され得る。

【 0 0 2 3 】

好ましくは、該化合物は、ゼロ、1つ、または2つのグリコシドを含み、該グリコシドのいずれもさらなるグリコシドで置換されていない、D立体配置のものであることが好ましい。

【 0 0 2 4 】

式ⅠⅠⅠの選択された実施形態において、 X^6 、 X^7 、 X^8 および OR^4 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから独立して選択され、ヒドロキシおよびグリコシドから選択されることが好ましい。さらなる実施形態において、 X^8 および OR^4 の各々は、OHであり、 X^6 および X^7 の各々が、ヒドロキシおよびグリコシドから独立して選択される。なお、さらなる実施形態において、 OR^4 、 X^6 および X^8 の各々は、OHであり、 X^7 は、グリコシドである。式ⅠⅠⅠの例示的化合物は、ギンセノシドRH1である。

【 0 0 2 5 】

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で溶媒中に処方した式Ⅰ、ⅠⅠまたはⅠⅠⅠの好ましい化合物は、本明細書に記載されたTRAPアッセイで測定した時、前記溶媒で処理されたケラチノサイトまたは線維芽細胞中のテロメラーゼ活性レベルをTRAPアッセイにおいて測定した時よりも、前記細胞における少なくとも50%超で、テロメラーゼ活性レベルを生じる上で有効である。さらに好ましい実施形態において、該化合物は、本明細書に記載されたTRAPアッセイで測定した時、前記溶媒で処理されたケラチノサイトまたは線維芽細胞中のテロメラーゼ活性レベルをTRAPアッセイにおいて測定した時よりも、前記細胞における少なくとも100%超で、テロメラーゼ活性レベルを生じるのに有効である。

【 0 0 2 6 】

式Ⅰ～ⅠⅠⅠの例示的化合物としては、図1に示されたものが挙げられ、本明細書において、1 (アストラガロシドⅠⅤ)、2 (シクロアストラゲノール)、3 (アストラゲノール)、4 (アストラガロシドⅠⅤ 16 - オン)、5 (2OR, 24S - エポキシ - 3, 16, 25 - トリヒドロキシ - 9 - メチル - 19 - ノルラノスタ - 1, 5 - ジエン)、6 (シクロアストラゲノール6 - D - グルコピラノシド)、7 (シクロアストラゲノール3 - D - キシロピラノシド)、および8 (ギンセノシドRH1)と指定される。選択された実施形態において、該化合物は、本明細書において、1 (アストラガロシドⅠⅤ)、2 (シクロアストラゲノール)、3 (アストラゲノール)、4 (アストラガロシドⅠⅤ 16 - オン)、5 (2OR, 24S - エポキシ - 3, 16, 25 - トリヒドロキシ - 9 - メチル - 19 - ノルラノスタ - 1, 5 - ジエン)、6 (シクロアストラゲノール6 - D - グルコピラノシド)、および7 (シクロアストラゲノール3 - D - キシロピラノシド)と指定されるものから選択される。さらなる実施形態において、該化合物は、本明細書において、1、2、3、4および5と指定されるものから選択される。一実施形態において、該化合物は、アストラガロシドⅠⅤ(1)またはシクロアストラゲノール(2)である。

式Ⅰ、ⅠⅠまたはⅠⅠⅠの単離化合物の処方物を、細胞または組織に接触させる方法は、前記接触前に、テロメラーゼ活性の増大が望まれる細胞または組織を同定することを含み得る。細胞または組織におけるテロメラーゼ活性の増大によって実現すべき利益としては、例えば、前記細胞または前記組織内の細胞の複製能力の増強および/または寿命の延長が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

該方法は、対象の細胞または組織におけるテロメラーゼ活性の増大が望まれるような対象における状態の診断、およびその対象への処方物の投与を含み得る。該対象は、ヒト対象またはヒト患者などの哺乳動物対象であることが好ましい。このような状態としては、例えば、HIV感染、神経変性疾患、骨または関節の変性疾患、黄斑変性、アテローム硬化症および貧血などの種々の変性疾患を挙げることができる。このような状態としては、例えば、火傷、擦過傷、切創、移植片部位、感染性因子により生じる病変部、慢性静脈潰

10

20

30

40

50

瘍、糖尿病性潰瘍、圧迫潰瘍、床擦れ、粘膜潰瘍、およびケロイド形成など、表皮の創傷または他の急性もしくは慢性の状態を挙げることできる。

【 0 0 2 8 】

したがって、本発明は、上記の患者などの患者の細胞または組織におけるテロメラーゼ活性を増大させることにより、前記患者における状態を治療する方法を提供し、前記方法は、そのような治療を必要とする患者に、上記に定義した式 I、式 I I または式 I I I の単離化合物の処方物を投与することを含んでなる。該組成物は、種々の経路、例えば、経口、局所または非経口で投与できる。

【 0 0 2 9 】

本発明は、対象の細胞または組織におけるテロメラーゼ活性を増大させることにより、対象における治療を必要とする対象に、薬学的ビヒクル中の上記式 I、I I または I I I の化合物、好ましくは、式 I または I I の化合物を投与する方法をさらに提供する。

【 0 0 3 0 】

さらなる態様において、本発明は、表皮細胞を、上記に定義された式 I、式 I I または式 I I I の単離化合物の局所処方物と接触させることを含んでなる、表皮の急性もしくは慢性状態を治療する方法を提供する。好ましい実施形態において、該化合物は、式 I または式 I I の化合物である。さらなる実施形態において、該化合物は、アストラガロシド I V、シクロアストラゲノール、アストラゲノール、アストラガロシド I V 16 - オン、シクロアストラゲノール 6 - D - グルコピラノシド、シクロアストラゲノール 3 - D - キシロピラノシド、および 20 R, 24 S - エポキシ - 3, 16, 25 - トリヒドロキシ - 9 - メチル - 19 - ノルラノスタ - 1, 5 - ジエン（本明細書において、5 と指定）から選択される。

【 0 0 3 1 】

該処方物を接触させる細胞としては、また、例えば、細胞ベースの療法のためのエキソビボで接触される外植細胞または培養における他の細胞を挙げることできる。したがって、本発明は、上記に定義した化合物の選択された実施形態を含む、前記細胞を、上記に定義した式 I、式 I I または式 I I I の化合物を含んでなる組成物の有効量に接触させることを含む、インビトロまたはエキソビボで細胞の複製能力を高める方法を提供する。好ましい実施形態において、該化合物は、上記に定義した化合物の選択された実施形態を含む、式 I または式 I I の化合物である。一般に、該細胞は、非形質転換哺乳動物細胞であり；選択された実施形態において、該細胞は、骨髓幹細胞などの幹細胞、骨髓間質細胞、幼若または初期継代皮膚線維芽細胞、小島前駆体細胞、ニューロスフェア細胞、副腎皮質細胞、筋衛星細胞、骨芽細胞、網膜色素上皮細胞および H I V 制限 C D 8 ⁺ 細胞である。

【 0 0 3 2 】

関連した一態様において、本発明は、薬学的に受容可能なビヒクルにおける上記に示された式 I の化合物を含んでなる薬学的組成物を提供し、式中：

X ¹ および X ² の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケト、およびグリコシドから独立して選択され；

X ₃ は、ケトであり；

O R ¹ は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択され；

前記グリコシド上の任意のヒドロキシル基は、前記化合物が最大 3 つのグリコシドを含むように、さらにグリコシド、低級アルキル、または低級アシルにより置換され得；および

R ² が、メチルであり、以下：

【 0 0 3 3 】

【 化 2 2 】

が、9 位の炭素と 11 位の炭素との間の二重結合を表すか；または R ² が、9 位の炭素と

10

20

30

40

50

一緒になって縮合シクロプロピル環を形成し、以下：

【 0 0 3 4 】

【 化 2 3 】

が、9位の炭素と11位の炭素との間の単結合を表す。

【 0 0 3 5 】

該化合物は、ゼロ、1つまたは2つのグリコシドを含み、該グリコシドのいずれもさらなるグリコシドで置換されないことが好ましく、グリコシドは、D立体配置のものであることが好ましい。

10

【 0 0 3 6 】

該組成物の選択された実施形態において、 X^1 は、OHまたはグリコシドであり、 X^2 および OR^1 の各々は、独立してOHまたはグリコシドである。一実施形態において、該化合物は、アストラガロシドIV 16-オン（本明細書において4と指定）である。

【 0 0 3 7 】

あるいは、該組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルにおける上記に示された式Iの化合物を含んでなり、式中：

X^1 および X^2 のうちの1つは、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびケトから選択され、および他は、グリコシドであり；

X_3 および OR^1 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから独立して選択され；

20

前記グリコシド上の任意のヒドロキシル基は、前記化合物が最大3つのグリコシドを含むように、さらにグリコシド、低級アルキル、または低級アシルにより置換され得；および

R^2 が、メチルであり、以下：

【 0 0 3 8 】

【 化 2 4 】

が、9位の炭素と11位の炭素との間の二重結合を表すか；または R^2 が、9位の炭素と一緒に縮合シクロプロピル環を形成し、以下：

30

【 0 0 3 9 】

【 化 2 5 】

が、9位の炭素と11位の炭素との間の単結合を表す。

【 0 0 4 0 】

該化合物は、1つのグリコシドを含み、該グリコシドがさらなるグリコシドで置換されていないことが好ましく、グリコシドは、D立体配置のものであることが好ましい。一実施形態において、該化合物は、シクロアストラゲノール6 - D - グルコピラノシド（本明細書中に6と指定）およびシクロアストラゲノール3 - D - キシロピラノシド（本明細書中に7と指定）から選択される。

40

【 0 0 4 1 】

あるいは、該薬学的組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルにおける上記に定義された式IIの化合物を含んでなる。また、該化合物の選択された実施形態は上記に定義されている。一実施形態において、該化合物は、本明細書において5と指定される化合物である。

【 0 0 4 2 】

また、本発明は、上記に定義され選択された実施形態を含む、上記に定義された式IIの化合物も提供する。一実施形態において、該化合物は、本明細書において5と指定され

50

る化合物である。

【0043】

関連した一態様において、本発明は、上記に定義された式Ⅰ、式ⅠⅠまたは式ⅠⅠⅠの単離化合物の局所用製薬処方物を提供する。また、該化合物の選択された実施形態は上記に定義されている。好ましい実施形態において、該化合物は、式Ⅰまたは式ⅠⅠの化合物である。さらなる実施形態において、該化合物は、アストラガロシドⅠⅤ、シクロアストラゲノール、アストラゲノール、アストラガロシドⅠⅤ 16-オン、シクロアストラゲノール6- -D-グルコピラノシド、シクロアストラゲノール3- -D-キシロピラノシド、および20R, 24S-エポキシ-3, 16, 25-トリヒドロキシ-9-メチル-19-ノルラノスタ-1, 5-ジエン（本明細書において、5と指定）から選

10

【0044】

他の関連した一態様において、本発明は、上記に定義された式Ⅰ、式ⅠⅠまたは式ⅠⅠⅠの単離化合物の栄養剤処方物を含んでなる栄養剤組成物を提供する。また、該化合物の選択された実施形態は上記に定義されている。好ましい実施形態において、該化合物は、上記の選択された実施形態を含めて、式Ⅰまたは式ⅠⅠの化合物である。さらなる実施形態において、該化合物は、アストラガロシドⅠⅤ、シクロアストラゲノール、アストラゲノール、アストラガロシドⅠⅤ 16-オン、シクロアストラゲノール6- -D-グル

20

【0045】

上記の選択された実施形態を含めて、上記に定義された式Ⅰ、ⅠⅠまたはⅠⅠⅠの単離化合物は、細胞または組織におけるテロメラーゼ活性を増大させることによる治療を必要とする疾病を治療する薬剤の製造にも使用できる。そのような疾病の例は、下記でより詳細に検討されている。同様に、上記の選択された実施形態を含めて、上記に定義された式Ⅰ、ⅠⅠまたはⅠⅠⅠの単離化合物はまた、表皮の急性もしくは慢性状態の治療用の薬剤製造に使用できる。そのような使用法の好ましい実施形態において、該単離化合物は、上記式Ⅰまたは式ⅠⅠの選択された実施形態を含めて、式Ⅰまたは式ⅠⅠの単離化合物である。

30

【0046】

細胞内のテロメラーゼ活性を増大させるために有効な化合物を選択する方法もまた提供される。本法によれば、上記に定義された式Ⅰ、式ⅠⅠ、式ⅠⅠⅠの化合物の誘導体が、本明細書に記載されたTRAPアッセイにより測定された時にケラチノサイトまたは線維芽細胞内のテロメラーゼ活性を増大させるその能力に関して試験される。もし1 μg / ml以下の濃度において溶媒中に処方された誘導体が、TRAPアッセイで測定された時、前記溶媒で処理したケラチノサイトまたは線維芽細胞内のテロメラーゼ活性の測定されたレベルよりも、前記細胞における少なくとも50%超、好ましくは少なくとも100%超のテロメラーゼ活性レベルを生じる上で有効である場合に選択される。次いで、この誘導体を、局所用、処方用または栄養ビヒクルと共に処方できる。

40

【0047】

また、関連した一実施形態において、表皮の急性もしくは慢性状態の治療用薬剤を選択する方法も提供される。本法によれば、上記に定義された式Ⅰ、式ⅠⅠ、式ⅠⅠⅠの化合物の誘導体は、本明細書に記載されたスクラッチアッセイにおいて、ケラチノサイトまたは線維芽細胞内の創傷治癒活性に関して試験される。該誘導体は、スクラッチアッセイに

50

において測定した時に、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、溶媒コントロールの創傷治癒活性よりも50%超、好ましくは溶媒コントロールの創傷治癒活性よりも100%超で創傷治癒活性を有する場合に選択される。次いでこの誘導体を、局所用ビヒクルと共に処方できる。

【0048】

本発明のこれらの、および他の目的のならびに特徴は、添付の図面と関連させて、以下の本発明の詳細な説明を読むことにより、さらに十分に明らかとなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

(発明の詳細な説明)

(I. 定義)

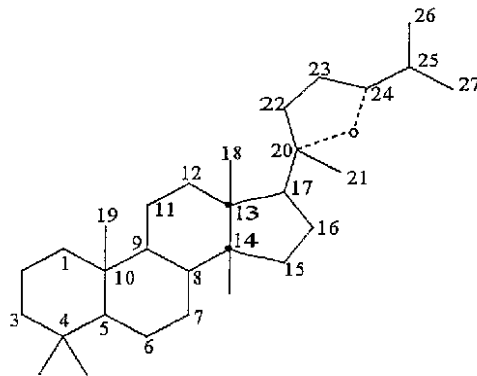
本明細書に用いられる以下の用語は、他に指示されない限り、下記の意味を有する。

【0050】

本明細書に記載された化合物の命名に用いられた一般的な炭素原子番号付け体系は、下記に示されている(構造IIの化合物は、この体系に示された19位炭素を欠き、構造IIIの化合物は、18位炭素を欠いていることに注意されたい。したがって、この番号付け体系は、本発明の組成物を限定する意図はない)。

【0051】

【化26】



「アルキル」は、分枝状または線状であり得る、炭素および水素を含有する完全に飽和した非環式の一価の基を言う。アルキル基の例としては、メチル、エチル、*n*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ヘプチルおよびイソプロピルがある。「アルコキシ」は、Rが上記に定義したアルキルである式ORの基を言う。「アシルオキシ」は、Rが上記に定義したアルキルである式-OC(=O)Rの基を言う。したがって、「アシル」は、-C(=O)R基を言う。

【0052】

「低級アルキル」(または、低級アルコキシまたは低級アシルオキシ)は、1個から6個の炭素原子を有するような基を言い、選択された実施形態において、このような基は、1個から4個の炭素原子、1個から2個の炭素原子または1個の炭素原子を含む(すなわち、メチル、メトキシ、アセチルオキシ)。

【0053】

「幹細胞」は、出生後の寿命をとおして分裂し、サイクルする能力を保持する共通系列の比較的未分化の細胞を言い、さらに分化し、特殊化し得る細胞を提供する(例えば、皮膚の基底層における、または種々のあらゆるタイプの血液細胞が由来する骨髄における原始細胞などの造血組織における幹細胞)。

【0054】

化合物に関して「細胞内テロメラーゼ活性の増大に有効な」とは、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度で、該化合物を含有する組成物が、本明細書に記載されたTRAPアッセイで測定された時に、該化合物を含有しない同様の処方物をTRAPアッセイで測定された時に生じるレベルより、少なくとも1.5の因数でより高い(すなわち、少なくとも50%超)ケ

10

20

30

40

50

ラチノサイトまたは線維芽細胞内のテロメラーゼ活性レベルを生じさせるために有効であることを意味する。好ましい実施形態において、該化合物は、本明細書に記載されたＴＲＡＰアッセイで測定された時に、該化合物を含有しない同様の処方物により生じるレベルよりも少なくとも２の因数でより高く（すなわち、少なくとも１００％超）、このような細胞内のテロメラーゼ活性レベルを生じさせるために１μg/ml以下の濃度で有効である。

【００５５】

患者への化合物の投与に関して、「有効量」とは、所望の治療結果が達成されるような、患者の細胞または組織内のテロメラーゼ活性を増大させるための有効な量を言う。インビトロまたはエキソビボでの細胞の治療に関して、「有効量」とは、細胞内のテロメラーゼ活性を増大させ、それによって細胞の複製能力を増大および／または寿命を延長させるために有効な量を言う。

10

【００５６】

本明細書において％（w/v）で表される濃度において、１００％（w/v）は、１gの溶質/ml溶媒に相当する。例えば、０．１％（w/v）＝１mg/ml。

【００５７】

「単離化合物の処方物」とは、処方物を作製するために、単離化合物を１種以上の他の成分（活性成分であっても、または不活性成分であってもよい）と組み合わせることにより調製される処方物を言う。該化合物が天然源から直接精製された場合、「単離化合物」の語句は、該化合物（処方前の）が、天然源における該化合物の純度に比較して、１００倍以上精製されていることを必要とする。該化合物が天然源から直接精製されていない場合、「単離化合物」の語句は、（処方前に）１つ以上の化学合成工程を含む方法によって製造され、該化合物の調製物が、５％（w/v）以上の純度を生じさせる化合物を言う。

20

【００５８】

（ⅠⅠ． テロメラーゼ活性を増大させるための方法および組成物）

本発明によれば、細胞内のテロメラーゼ活性を増大させるために、組成物および方法が提供される。本法によれば、細胞または組織を、該化合物の不在下における細胞または組織内のテロメラーゼ活性レベルに比較して、細胞または組織内のテロメラーゼ活性を増大させるための有効な量において、本明細書に開示された式Ⅰ、ⅠⅠまたはⅠⅠⅠの単離化合物の処方物と接触させる。また、該方法は、テロメラーゼ活性の増大が望まれる細胞または組織を同定する予備工程を含み得る。

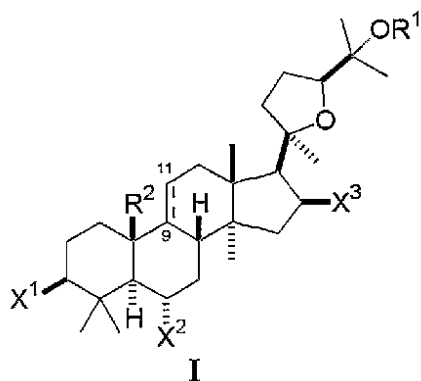
30

【００５９】

一実施形態において、該化合物は、式Ⅰ：

【００６０】

【化２７】



40

により表される。

【００６１】

式Ⅰにおいて、X¹、X²、およびX³の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケト、およびグリコシドから独立して選択され、OR¹基は、ヒドロキシ

50

、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択される。選択された実施形態において、 X^1 および X^2 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよびグリコシドから独立して選択される。

【 0 0 6 2 】

式 I の選択された実施形態において、 R^2 は、メチルであり、以下：

【 0 0 6 3 】

【 化 2 8 】

は、9位の炭素と11位の炭素との間の二重結合を表す。他の実施形態において、 R^2 は、9位の炭素と一緒にあって縮合シクロプロピル環を形成し、以下：

【 0 0 6 4 】

【 化 2 9 】

は、例えば、化合物 1 (図 1 を参照) に示されるように、9位の炭素と11位の炭素との間の単結合を表す。

【 0 0 6 5 】

式 I、II または III の対象化合物 (または、それらの誘導体) のいずれに関しても、本明細書で用いられる「グリコシド」は、公知のグリコシド (すなわち、リボシド、アラビノシド、キシロシド、リキソシド、アルトロシド、グルコシド、マンノシド、グロシド、イドシド、ガラクトシドおよびタロシド) の1つを意味する。該グリコシドは、典型的に6員環 (ピラノース) 形態、例えば、グルコピラノシドまたはマンノピラノシドである。選択された実施形態において、該グリコシドは、D - グリコシドである。すなわち、それは、天然単糖に見られる立体配置を有する。具体的な例としては、D - リボピラノシド、D - アラビノピラノシド、D - キシロピラノシド、D - グルコピラノシド、マンノピラノシドおよび D - ガラクトピラノシドが挙げられる。好ましいグリコシドとしては、D - グルコピラノシドおよび D - キシロピラノシドが挙げられる。さらなる実施形態において、該結合は、立体配置の結合、例えば、 α - D - グルコピラノシドである。

【 0 0 6 6 】

式 I、II または III の対象化合物 (または、それらの誘導体) に存在するグリコシド環上のいずれの遊離ヒドロキシル基も、さらなるグリコシド、低級アルキルまたは低級アシル、例えばメトキシまたはアセチルオキシによってさらに置換されてもよい。このようなヒドロキシル基の多くて1つが、さらなるグリコシドによって置換されることが好ましい。このようなヒドロキシル基が、さらなるグリコシドによって置換されない；すなわち、置換基は、アセチルなどの低級アシルまたはメチルなどの低級アルキルであることが、より好ましい。一実施形態において、該グリコシド (1 つまたは複数の) 上の全てのヒドロキシル基は非置換である。

【 0 0 6 7 】

式 I、II または III の対象化合物 (または、それらの誘導体) は、最大3つのグリコシドを含むことが好ましく、また最大2つのグリコシドを含むことがより好ましい。選択された実施形態において、該化合物は、ゼロ、1つまたは2つのグリコシドを含み、該グリコシドのいずれもさらなるグリコシドによって置換されない。さらなる選択された実施形態において、特に式 I に関して、該化合物は、ゼロまたは2つのグリコシドを含み、該グリコシドのいずれもさらなるグリコシドによって置換されない。

【 0 0 6 8 】

式 I の選択された実施形態において、 X^1 および X^2 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、グルコピラノシドおよびキシログリコシドから独立して選択され、 X^3 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケト、グルコピラノシドおよびキシログリコシドから、好ましくは、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシル

10

20

30

40

50

オキシおよびケトから選択される。

【0069】

式 I のさらなる実施形態において、 X^1 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよび - D - キシロピラノシドから選択され； X^2 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよび - D - グルコピラノシドから選択され； X^3 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよびケト (= O) から選択され；OR¹ は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよび - D - グルコピラノシドから選択される。

【0070】

式 I のさらなる選択された実施形態において、 X^1 は、OH またはグリコシドであり、 X^2 および OR¹ の各々は、独立して OH またはグリコシドであり、 X^3 は、OH またはケトである。さらなる実施形態において、 X^1 および X^2 の各々は、OH またはグリコシドであり、OR¹ は、OH であり、 X^3 は、OH である。なおさらなる実施形態において、 X^1 は、- D - キシロピラノシドであり、 X^2 は、- D - グルコピラノシドであり、OR¹ は、OH であり、 X^3 は、OH である。他の実施形態において、 X^1 、 X^2 、 X^3 および OR¹ の各々は、OH である。

【0071】

これらの記載された実施形態の各々に関して、さらなる実施形態は、R² が、メチルであり、以下：

【0072】

【化30】

が、二重結合を表す化合物を含み、一般に好ましい他の実施形態は、R² が、9位の炭素と一緒に縮合シクロプロピル環を形成する化合物を含む。

【0073】

本発明の方法に用いられる構造 I の例示的化合物としては、図 1 に示され、本明細書において、1 (アストラガロシド I V)、2 (シクロアストラゲノール)、3 (アストラゲノール)、4 (アストラガロシド I V 16 - オン)、6 (シクロアストラゲノール 6 - D - グルコピラノシド)、および 7 (シクロアストラゲノール 3 - D - キシロピラノシド) と指定されるものが挙げられる。

【0074】

3 - D - グリコピラノシドによって置換されたシクロアストラゲノール (2) の骨格構造を有する他の化合物もまた、本発明の方法における使用が考慮されている。該化合物は、骨格構造の別個の炭素に結合した合計 1 つまたは 2 つのグリコシドを含むことが好ましい (すなわち、1 つのグリコシドは、さらなるグリコシドと結合していない)。例としては、天然化合物のアストラガロシド A、1、2 および 7 ならびにアストラベルシン (astraverucin) I および II (Astragalus verrucosus から単離できる) が挙げられる。

【0075】

本発明はまた、 X^1 および X^2 の 1 つは、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびケトから選択され、他は、グリコシドである式 I の 1 つ以上の化合物を含んでなる薬学的組成物を提供する。さらなる実施形態において、該化合物は、6 および 7 と指定されるものから選択される。他の実施形態において、該薬学的組成物は、 X_3 がケトである式 I の化合物を含み；一実施形態において、該化合物は、4 と指定される化合物である。

【0076】

他の態様において、本発明は、式 I I

【0077】

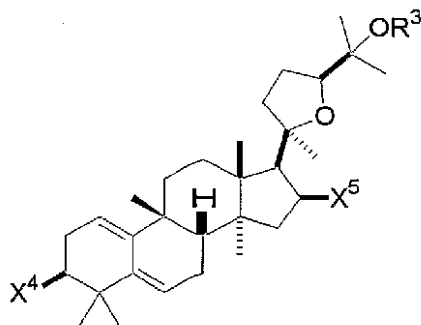
10

20

30

40

【化 3 1】



10

II

によって表される化合物を含んでなる薬学的組成物を提供する。

【0078】

式IIにおいて、 X^4 および X^5 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびケト、ならびにグリコシドから独立して選択され、 OR^3 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択され；「グリコシド」およびその種々の実施形態は、上記のとおりである。上記のとおり、該化合物は、最大3つのグリコシドを含み、より好ましくは、最大2つのグリコシドを含む。選択された実施形態において、該化合物は、ゼロ、1つまたは2つのグリコシドを含み、該グリコシドのいずれもさらなるグリコシドによって置換されない。

20

【0079】

式IIの選択された実施形態において、 X^4 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択される。さらなる実施形態において、 X^4 、 X^5 および OR^3 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、グルコピラノシドおよびキシロピラノシドから独立して選択される。

【0080】

式IIのさらなる実施形態において、 X^4 および OR^3 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよびグリコシド、好ましくは、D-キシロピラノシドまたはD-グルコピラノシドから選択され、 X^5 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよびケト(=O)から選択される。これらの実施形態において、 OR^3 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシから選択されることが好ましく、ヒドロキシであることがより好ましい。

30

【0081】

式IIのさらなる実施形態において、 X^4 、 X^5 および OR^3 の各々は、独立してOHまたはグリコシド、例えば、D-キシロピラノシドまたはD-グルコピラノシドである。なおさらなる実施形態において、 X^4 は、OHまたはグリコシドであり、 X^5 および OR^3 の各々は、OHである。一実施形態において、 X^4 、 X^5 および OR^3 の各々は、OHである。この化合物(正式の名称は、20R, 24S-エポキシ-3, 16, 25-トリヒドロキシ-9-メチル-19-ノルノスタ-1, 5-ジエン)は、本明細書において、5と指定される。

40

【0082】

本発明はまた、 X^4 および X^5 の各々が、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケトおよびグリコシドから独立して選択され、 OR^3 が、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから選択され、前記グリコシド上のいずれかのヒドロキシル基が、さらなるグリコシド、低級アルキルまたは低級アシルによって置換されてもよい、上記式IIの化合物を提供する。選択された実施形態において、該化合物はゼロ、1つまたは2つのグリコシドを含む。前記各グリコシドが存在する場合、D立体配置であることが好ましい。さらなる実施形態において、 X^4 および OR^3 の各々は、ヒ

50

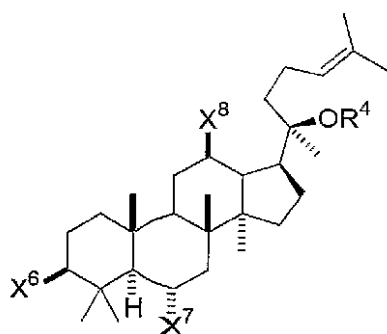
ドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよびグリコシドから選択され、 X^5 は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシおよびケト(=O)から選択される。なおさらなる実施形態において、 X^4 は、OHまたはグリコシドであり、 X^5 および OR^3 の各々は、OHである。一実施形態において、 X^4 、 X^5 および OR^3 の各々は、OH；すなわち本明細書で5と指定される化合物である。

【0083】

さらなる一態様において、本発明は、細胞または組織を、式IIIの単離化合物の処方物と接触させることにより、細胞または組織内のテロメラーゼを増加させる方法を提供する。該方法はやはり、テロメラーゼ活性の増大が望まれる細胞または組織を同定する工程を含み得る。

【0084】

【化32】



III

。

【0085】

式IIIにおいて、 X^6 、 X^7 、 X^8 および OR^4 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、ケトおよびグリコシドから独立して選択され、「グリコシド」およびその実施形態は、上記に定義されたとおりである。該化合物は、いずれもさらなるグリコシドによって置換されていない、好ましくは、最大2つのグリコシド、より好ましくは、最大1つのグリコシドを含む。好ましいグリコシドとしては、D-グルコピラノシドおよびD-キシロピラノシドが挙げられる。

【0086】

構造IIIの選択された実施形態において、 X^6 、 X^7 、 X^8 および OR^4 の各々は、ヒドロキシ、低級アルコキシ、低級アシルオキシ、およびグリコシドから独立して選択され、好ましくは、ヒドロキシおよびグリコシドから選択される。

【0087】

構造IIIのさらなる実施形態において、 X^8 および OR^4 の各々は、OHであり、 X^6 および X^7 の各々は、ヒドロキシおよびグリコシド、例えば、D-グルコピラノシドから独立して選択される。さらなる実施形態において、 OR^4 は、OHである。好ましくは、 X^6 および X^8 の各々も、OHであり、 X^7 は、グリコシドである。構造IIIの例示的化合物の1つは、本明細書において8と指定されるギンセノシドRH1である。

【0088】

(III. 式I~IIIの化合物の出所および合成)

式I、IIおよびIIIの化合物は、一般に天然物から単離または合成できる。例えば、アストラガロシドI~VIIは、例えば、A. Kadotaら、特開昭62-012791号(1987)に記載されているとおり、*Astragalus membranaceus*の根から単離できる。そこで報告されているとおり、有益な薬草の種々の出所から商品として入手できる根組織(8kg)を、MeOHと共に還流し、その濃縮抽出エキスを(200g)をMeOHに再溶解して、溶出液としてCHCl₃/MeOH/H₂Oの

10

20

30

40

50

混液を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより分画する。同様の溶媒混合物を用いて、逆相クロマトグラフィにより、各画分を後処理して、凡そ以下の量の単離化合物を得る：アセチルアストラガロシドⅠ（0.2 g）、アストラガロシドⅠ（3.5 g）、イソアストラガロシドⅠ（0.3 g）、アストラガロシドⅡ（2.3 g）、アストラガロシドⅢ（1.0 g）、アストラガロシドⅣ（0.8 g）、アストラガロシドⅤ（0.1 g）、アストラガロシドⅥ（0.3 g）およびアストラガロシドⅦ（0.1 g）。また、Kitagawara、Chem. Pharm. Bull. 31（2）：p. 698 - 708（1983b）も参照されたい。

【0089】

アストラガロシドⅣ（本明細書において1と指定）はまた、Ai Chunmei、Chengdu 610041、P. R. Chinaの本著者によっても得られた。

10

【0090】

シクロアストラゲノール（2）は、下記の実験の節（実施例1）に記載されるとおり、アストラガロシドⅣ（1）をメタノール性HClで処理した後、中和し、標準的な後処理をし、クロマトグラフィにより精製することにより調製できる。また、シクロアストラゲノールは、P - H Wangら、J. Chinese Chem. Soc. 49：p. 103 - 6（2002）により記載されたように、Astragalus membranaceusのブタノール抽出物を酸化的分解（酸素およびナトリウム元素による処理）することによっても得ることができる。また、アストラゲノール（3）およびシクロアストラゲノール（2）は、Kitagawara、Chem. Pharm. Bull. 31（2）：p. 689 - 697（1983a）の方法によっても得ることができる。

20

【0091】

本明細書において6と指定される化合物（シクロアストラゲノール6 - D - グルコピラノシド）および7と指定される化合物（シクロアストラゲノール3 - D - キシロピラノシド）は、下記の実験の節（実施例2）に記載されるとおり、メタノール中、アストラガロシドⅣおよび硫酸溶液を還流後、標準的な後処理およびシリカゲルクロマトグラフィにより得られた。また、転移生成物5およびアグリコン、すなわちシクロアストラゲノール（2）も得られた。

【0092】

16 - ケト化合物4は、アストラガロシドⅣのグリコシドヒドロキシル基のアセチル化後、16 - ヒドロキシルのピリジニウムクロクロメート酸化および水素化ホウ素ナトリウムを用いた処理によるグリコシドヒドロキシルの回復により調製された（上記引用のKitagawara、1983bを参照）。

30

【0093】

式Ⅰ～Ⅲの種々の実施形態、例えば、様々な程度にアルキル化またはアシル化した、またはケト基を有する化合物は、シクロアストラゲノール、アストラゲノール、アストラガロシド類またはアストラベルシノン類またはパナキサトリオールなどの天然の、および/または商品として入手できる出発物質を用い、必要ならば生成物を分離して、有機合成の公知の方法によって調製することができる。下記の実験の節に幾つかの例が提供されている。例えば、立体障害の少ない3 - 、6 - および/または16 - ヒドロキシル基を、一般に例えば、アシル化によって選択的に修飾できる。所望の場合、次いで未反応のヒドロキシル基を、例えば、アルキル化後、任意にアシル基を除去することにより、別々に修飾することができる。融合シクロプロピル環を有する式Ⅰの化合物（例えば、シクロアストラゲノール類）は、硫酸処理によって、19 - メチル基および9 - 11二重結合を有する化合物（例えば、アストラゲノール類）へと変換できる。この反応は、下記の実施例9Bおよび10Bの反応に示される脱グリコシル化によって達成できる。

40

【0094】

（Ⅳ. 生物学的活性の決定）

（A. TRAPアッセイプロトコル）

細胞内のテロメラゼ活性を増大させる化合物の能力は、当業界に公知のTRAP（テ

50

ロメア反復増幅プロトコル) アッセイを用いて決定することができる(例えば、Kimら、米国特許第5,629,154号; Harleyら、米国特許第5,891,639号)。本明細書に用いられる「TRAPアッセイで測定されたテロメラーゼ活性」とは、以下のプロトコルに従って、ケラチノサイトまたは線維芽細胞において測定されたテロメラーゼ活性を言う。該活性は、典型的にこのような細胞のコントロールアッセイにおいて、同様に測定された活性と比較される(例えば、溶媒コントロールにおいて見られたものより50%超のテロメラーゼ活性)。

【0095】

該アッセイにおける使用に好適な細胞系、好ましくは、正常ヒト線維芽細胞(NHF)または正常ヒトケラチノサイト(NHK)は、Cascade Biologics、オレゴン州ポートランド所在または4C Biotech、ベルギー国Seneffe所在、などの商業的供給源、またはATCC(American Type Culture Collection)から得ることができる。ATCCウェブサイトで探索できるATCC正常ヒト線維芽細胞系としては、例えば、CCL135、CCL137およびCCL151が挙げられる。

10

【0096】

細胞は、増殖培地(例えば、Cascade Biologics社により供給されるEpi-Life培地+ケラチノサイト増殖因子補足物+60mM CaCl₂)中、2日間、凡そ5000細胞/ウェルで平板培養される。95%エタノールまたはDMSOなどの好適な溶媒中、試験組成物を、ある範囲の濃度で選択されたウェルに加え、16~24時間温置する。本明細書に報告されたデータに関して、使用された溶媒はDMSOであった。

20

【0097】

細胞溶解溶液は、5.0mLのDNアーゼ、RNアーゼの無いH₂O(DNアーゼ、RNアーゼの無いH₂Oは、DEPC(ジエチルピロカーボネート)処理により作製できるか、またはSigmaなどの販売会社から購入できる)に、3.0mLのNonidet(登録商標)P40、1.0mLのCHAPS溶解緩衝液(下記参照)および1.0mLの10X TRAP緩衝液(下記参照)を加えることによって調製される。

【0098】

処理された細胞の形態を先ず、顕微鏡下で観察し、異常な増殖の目視できる兆候がないことを確認する。培地をウェルから取り出し、細胞をPBS(CaおよびMgのない)にて2回濯ぐ。ディッシュを、好ましくは氷上で冷却し、細胞溶解緩衝液(下記参照)を加え(1ウェル当たり凡そ100μL)、ピペットを用いて数回上下して碎く。該細胞を、氷上で1時間培養する。

30

【0099】

【化33】

CHAPS溶解緩衝液

ストック	1mLに対して	最終濃度
1 M Tris-HCl pH 7.5	10 μl	10 mM
1 M MgCl ₂	1 μl	1 mM
0.5 M EGTA	2 μl	1 mM
100 mM AEBSF	1 μl	0.1 mM
10% CHAPS ^a	50 μl	0.5%
BSA	1 mg	1 mg/ml
100% グリセロール	100 μl	10%
DNアーゼ、RNアーゼを含まないH ₂ O 936 μl (1mLまで)		

40

^a CHAPS界面活性剤を、該溶解緩衝液の使用直前に加える。さらに、AEBSF(4

50

- (2 - アミノエチル) - ベンゼンスルホニルフルオリド H C l) を、抽出工程の直前に、該溶解緩衝液に加える。

【 0 1 0 0 】

【 化 3 4 】

10X TRAP 緩衝液

ストック	5 m L に対して	最終濃度
1M Tris-HCl, pH 8.3	1 ml	200 mM
1M MgCl ₂	75 µl	15 mM
1M KCl	3.15 ml	630 mM
Tween 20 (Boehringer Mannheim)	25 µl	0.5%
0.1M EGTA	500 µl	10 mM
20 mg/ml BSA	250 µl	1 mg/ml

10

以下の材料を合わせて、基本 P C R 混合物を作製する。

【 0 1 0 1 】

【 化 3 5 】

ストック	1 反応 (40 µ l) あたり	最終濃度 ^a
10X TRAP 緩衝液	5.0 µl	1X
2.5 mM dNTPs	1.0 µl	50 µM
Cy5-TS プライマー (0.1 mg/ml)	0.2 µl	0.4 ng/ml
ACX プライマー (0.1 mg/ml)	1.0 µl	2 ng/ml
TSU2 Int. Std. (1 pg/ml)	1.0 µl	20 fg/ml
U2 プライマー (0.1 mg/ml)	1.0 µl	2 ng/ml
Taq ポリメラーゼ (5U/µl)	0.4 µl	2 ユニット
DNアーゼ、RNアーゼを含まない H ₂ O	30.4 µl (合計 40 µ l まで)	

20

30

^a 4 0 µ l の P C R 混合物 プラス 1 0 µ l の細胞溶解液 = 5 0 µ l の最終容量に基づく。

【 0 1 0 2 】

P C R 混合物は、以下の成分を含む：C y 5 - T S プライマー、配列 5 ' - A A T C C G T C G A G C A G A G T T - 3 ' (配列番号：1) を有する 5 ' - C y 5 標識オリゴヌクレオチドは、テロメラーゼの基質である。培地のテロメラーゼ活性に依存して、テロメラーゼ反復 (配列 . . A G G G T T . . を有する) が基質に付加され、テロメラーゼ産物または T R A P 産物とも称されるテロメラーゼ延長産物を形成する。配列 5 ' - G C G C G G C T T A C C C T T A C C C T T A C C C T A A C C - 3 ' (配列番号：2) を有する A C X プライマーは、テロメラーゼ延長産物とハイブリダイズする固定復帰プライマーである。

40

【 0 1 0 3 】

定量目的で、少量の制限量の T S U 2 内部基準、配列 5 ' - A A T C C G T C G A G C A G A G T T A A A A G G C C G A G A A G C G A T - 3 ' ; 配列番号：3) を有するオリゴヌクレオチド、T S プライマー配列の延長が加えられる。配列 5 ' - A T C G C T T C T C G G C C T T T T (配列番号：4) を有する U 2 プライマーは、内部標準の 3 ' 領域にハイブリダイズするようにデザインされた復帰プライマーである。

【 0 1 0 4 】

反応管中、この P C R 混合物 4 0 µ L に、細胞溶解液サンプル (1 0 µ L) を加え、この混合物を室温 (3 0) で 3 0 分間温置する。以下に示された温度と時間、該混合物を

50

温置することによりPCRを実施する：94 / 30秒、60 / 30秒、72 / 30秒；この3工程サイクルを20～30サイクル、好ましくは31サイクル繰り返す。

【0105】

例えば、プロモフェノールブルーおよびキシレンシアノールを含有する添加染料を添加し、プロモフェノールブルーがゲルから消えるまで、該サンプルを0.6x TBE中、10～15%非変性PAGEに供する。CY5-標識テロメラーゼ産物の検出(650nmで最大励起；670nmで最大発光)のため、例えば、蛍光画像を用いて産物形成を観察する。

【0106】

増幅後のTSU2内部標準の最終量は、一般に50μLの反応混合物当たり5～10アモルである。この内部コントロールは、第1のテロメア付加産物の下に、ゲル上の明瞭な1本のバンドとして現れる特定の36量体PCR増幅産物(すなわち、TSオリゴヌクレオチドへの1つのテロメア付加後、ACX復帰プライマーによる増幅産物)を提供する。この内部コントロールバンドは、種々のサンプルのPCR増幅を正規化するために用いることができる。

【0107】

該アッセイで生成したテロメラーゼ産物分子(TM)の相対数は、下式：

$$TM = (T_{TRAP \text{ 産物}} - T_{BKD1}) / (T_{\text{内部標準}} - T_{BKD2})$$

によって決定され、

式中： $T_{TRAP \text{ 産物}}$ は、全てのテロメラーゼ産物に関してゲル上に測定された合計強度であり、 T_{BKD1} は、テロメラーゼ産物によって囲まれた面積と等しい大きさの面積に関して空白レーンにおいて測定された背景強度であり、 $T_{\text{内部標準}}$ は、内部標準に関する強度であり、 T_{BKD2} は、内部標準バンドによって囲まれた面積と等しい大きさの面積に関して空白レーンにおいて測定された背景強度である。結果として得られた数は、本明細書において、TMを決定する目的で30分と指定される所与の温置時間に生成したテロメラーゼ産物の分子数である。

【0108】

上記式I、IIまたはIIIの好ましい化合物は、1μg/ml以下の濃度で線維芽細胞またはケラチノサイトにおいて、溶媒コントロールにおいて見られるテロメラーゼ活性レベルより、少なくとも25%超のテロメラーゼ活性を生じさせることができる。より好ましくは、該化合物は、1μg/ml以下の濃度で溶媒コントロールにおいて見られるよりも、少なくとも50%超のテロメラーゼ活性を生じさせることができる。1μg/ml以下の濃度で、記載されたTRAPアッセイで測定した時、溶媒コントロールにおいて見られるテロメラーゼ活性レベルより、少なくとも約75%、100%または500%超のテロメラーゼ活性を生じさせる化合物など、さらに強力な活性が、幾つかの適用に関しては適切であり得る。

【0109】

(B・TRAPアッセイ結果の例)

上記式Iの化合物に関して、種々の濃度においてテロメラーゼ活性増大における有効性を評価した。アッセイは、上記のプロトコルに従い、HEKneoP細胞(新生児ケラチノサイト)において実施された。濃度は、DMSO中凡そ0.03μMから10μMの範囲であった。

【0110】

図2に示されているように、化合物1(アストラガロシドIV)を含有する組成物に関して、テロメラーゼ活性は、1.0μMにおいて、コントロールの約360%まで、濃度の増加につれて増加し、その後、濃度をさらに10μMへ増加させるにつれて低下した。図2に示されているように、2(シクロアストラゲノール)を含有する組成物に関して、テロメラーゼ活性は、0.1μMにおいて、コントロールの約300%まで増加し(10nMのEGF(上皮成長因子)によって処理された細胞における約200%に比較して)、その後、濃度をさらに増加させるにつれて低下した。

【 0 1 1 1 】

表 1 は、図 1 A ~ G に示された各化合物を含有する組成物に関して、DMSO コントロールにおいて見られるテロメラーゼ活性レベルの 2 倍（すなわち、100 % 超）のテロメラーゼ活性レベルを生じさせる化合物の最低有効濃度（MEC）を提供している。

【 0 1 1 2 】

【 表 1 】

表 1

記号指定	名称	MEC, μM
1	アストラガロシド I V	0.01
2	シクロアストラゲノール	0.01
3	アストラゲノール	0.03
4	アストラガロシド I V 16-オン	0.03
5	20R, 24S-エポキシ-3 β , 16 β , 25-トリヒドロキシ-9 β -メチル-19-ノルラノスト-15-ジエン	0.10
6	シクロアストラゲノール 6- β -D-グルコピラノシド	3.2
7	シクロアストラゲノール 3- β -D-キシロピラノシド	3.2
8	ギンセノシド RH 1	10

（ C . 創傷治癒アッセイプロトコル ）

式 I ~ I I I の化合物は、下記でさらに検討されるように、創傷、火傷、擦過傷または表皮の他の急性もしくは慢性状態の治癒を促進するために使用できる。本明細書で用いられる「スクラッチアッセイで測定された創傷治癒活性」は、以下のプロトコルに従って、ケラチノサイトまたは線維芽細胞において測定され、下式で示された W H の数値で表される活性を言う。

【 0 1 1 3 】

細胞をフラスコに塗布し（1つのフラスコ当たり 5×10^5 細胞）、5 % CO_2 、37 の加湿チャンバ内で 2 日間培養する。「創傷」を作出するために、2 ml のプラスチックピペットを静かに引き動かして細胞表面を「スクラッチ」する。理想的な創傷は、幅が約 2 ~ 3 mm、長さが 50 mm（組織培養フラスコの長軸に沿って）である。ビヒクル（DMSO；コントロールサンプル）または複数濃度の試験組成物のいずれかを含有する培地によって、該細胞を再処理する。細胞培養の連続 3 ~ 4 日間に亘って、創傷範囲を確認し、フラスコに印を付け、細胞の外観を写真により記録する。

【 0 1 1 4 】

ビヒクル処理細胞または他のコントロール細胞に対する化合物処理サンプルの創傷の幅を、経時的に測定することにより創傷閉包の量が決定される。測定は、1 日目（スクラッチ直後）、2 日目、3 日目、および 4 日目に各サンプルに関して、撮られた写真から行われる。創傷治癒のパーセンテージ（「創傷治癒活性」としても表される）を、下式：

$$W H = 100 - [100 \times W_n / W_o]$$

から算出し、

式中、 W_n は、n 日目の創傷の幅であり、 W_o は、1 n 日目の創傷の幅である。

【 0 1 1 5 】

上記の式 I ~ I I I の好ましい化合物は、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以下の濃度で、上記のケラチノサイトまたは線維芽細胞のスクラッチアッセイにおいて未処理細胞またはコントロール細胞に見られる創傷閉包量（創傷治癒活性）の少なくとも 25 % 大きな創傷閉包量を生じさせることができる。 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以下の濃度で、ケラチノサイトまたは線維芽細胞のスクラッチアッセイにおいて未処理細胞またはコントロール細胞に見られる創傷閉包量の少なくとも約 50 % または 100 % 大きな創傷閉包量を生じさせる化合物など、さらに強力な活性が、幾つかの適用に関しては適切であり得る。

【 0 1 1 6 】

(D . スクラッチアッセイ結果の例)

本発明の化合物 1 (アストラガロシド I V) および 2 (シクロアストラゲノール) の創傷治癒活性を、上記のスクラッチアッセイにより、老化ケラチノサイトにおいて評価した。典型的なアッセイ結果が図 4 に示されており、ここで、上段の画像は、コントロール細胞 (溶媒、 D M S O により処理) を示し、下段は、同じ溶媒中、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ (約 $0.13 \mu\text{M}$) の 1 で処理した細胞を示している。大きさの見分けられる「創傷」が、4日目に残っていたコントロール細胞とはコントロール的に処理細胞は、4日目で集密的であった。図 5 に示されるように、幼若ケラチノサイトにおいて、この組成物および $0.01 \mu\text{M}$ 2 (シクロアストラゲノール) により、同様の結果が見られた。

10

【 0 1 1 7 】

図 6 は、テロメラーゼ阻害オリゴヌクレオチド (G R N 1 6 3) およびコントロールオリゴヌクレオチド (G R N 1 3 7 2 2 7) の存在下および不在下において、同様のアッセイで測定した。老齢の成人ケラチノサイトにおける 1 (アストラガロシド I V) を含有する組成物の創傷治癒活性を示している。示されているように、テロメラーゼ阻害オリゴ G R N 1 6 3 は、1の組成物の創傷治癒作用を妨げるが；コントロールオリゴ G R N 1 3 7 2 2 6 の効果は、ごく小さい (G R N 1 6 3 は、テロメラーゼ R N A 成分のテンプレート領域を標的にするテロメラーゼ阻害オリゴヌクレオチドである。すなわち、G R N 1 6 3 は、P C T 国際公開第 0 1 / 1 8 0 1 5 号に詳述されている 1 3 単量体単位の N 3 ' P 5 ' チオホスホルアミデートオリゴヌクレオチドである。G R N 1 3 7 2 2 7 は、ミスマッチ配列を有する 1 3 単量体単位の N 3 ' P 5 ' チオホスホルアミデートコントロールオリゴヌクレオチドである) 。

20

【 0 1 1 8 】

下記の表 2 は、図 5 および図 6 に示されたスクラッチアッセイの結果に基づき、上記に示された式を用いて、それらのアッセイに用いられた化合物 1 および化合物 2 に関する W H 値 (創傷治癒活性) を示している。

【 0 1 1 9 】

【 表 2 】

表 2

	およその創傷幅 (任意の単位)				W H _{コントロール}	W H _{試験}
	1 日目 コントロール	4 日目 コントロール	1 日目 試験	1 日目 試験		
Fig. 4 (1)	22	10	17	0	54.5	100
Fig. 5 (1)	19	9	18	0	52.6	100
Fig. 5 (2)	19	9	21	2	52.6	90.5

30

図 7 は、テロメラーゼ阻害剤 (G R N 1 6 3) の存在下および不在下において、また $50 \text{ mg}/\text{mL}$ (約 2 mL) の P D G F (血小板由来成長因子) と比較した、老化新生児ケラチノサイトにおける、本発明の化合物 1 (アストラガロシド I V) に関する、コントロールのパーセントとしての創傷閉包をグラフで示している。示されているように、1の効果は、P D G F の効果に匹敵し、やはり G R N 1 6 3 の添加によって妨害された。

40

【 0 1 2 0 】

また、本発明は、本明細書に記載された T R A P アッセイにおいて、式 I、I I および I I I の化合物の誘導体をスクリーニングすることによりテロメラーゼ活性を増大させる上で効果的な追加化合物を選択する方法を提供する。この態様において、「誘導体」は、以下の方法の 1 つ以上において、式 I、I I および I I I の化合物の修飾により作製される化合物を含む：低級アルキルカルバメート基、ハロゲン基、チオール基、低級アルキルチオエーテル基、アミノ基、低級アルキルアミノ基、低級アルキルアミド基、アルデヒド基、またはヒドロキシル基のケト基への変換；そのようなアルデヒド基もしくはケト基への、または既存のケト基への低級アルキル基の付加 (例えば、さらなるヒドロキシル基を

50

形成するアルキル化)；炭素-炭素二重結合への、ハロゲン、ヒドロキシル、および/または水素の付加；ヒドロキシル基の除去(すなわち、水素への転換)；1つ以上のキラル中心、好ましくは、酸素担持キラル中心における立体化学の反転。本明細書中で用いられる場合、そのような修飾により作製される「誘導体」は、上記の式 I、II および III の化合物自体を除外する。

【0121】

これらの修飾は全て、求核置換など、周知の合成反応を用いて、標準的な合成法を用いて達成することができるが、これらには、トシレートなどのより良好な脱離基へのヒドロキシル基の変換；エステル化；アルキル化；酸化；還元；ハロゲン化；水和；水素化などが挙げられる。

10

【0122】

1つ以上の濃度において好適な溶媒ビヒクル中、処方された式 I、II または III の化合物の誘導体は、上記のケラチノサイトまたは線維芽細胞の TRAP アッセイにおいてスクリーニングされる。選択される好ましい誘導体としては、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で、溶媒中に処方された際に、TRAP アッセイで測定した時、前記溶媒で処理したケラチノサイトまたは線維芽細胞において測定されたテロメラーゼ活性レベルより少なくとも 50% 超、前記細胞におけるテロメラーゼ活性レベルを生じさせる上で有効な誘導体が挙げられる。

【0123】

あるいは、またはそれに加えて、1つ以上の濃度において好適な溶媒ビヒクル中、処方された式 I、II または III の誘導体は、上記のスクラッチアッセイにおける創傷治癒活性に関してアッセイされる。選択される好ましい誘導体としては、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で、溶媒コントロールの創傷治癒活性より、少なくとも 25% 超、より好ましくは、少なくとも 50% 超の創傷治癒活性を有する誘導体が挙げられる。

20

【0124】

(VI. 治療上の効能および治療法)

本発明は、細胞または組織を細胞内のテロメラーゼ活性を増大させる上で有効な量の上記 II 節で開示された式 I、II または III の単離化合物の処方物に接触されることにより、細胞内のテロメラーゼ活性を増大させる方法を提供する。該方法は、テロメラーゼ活性の増大が望まれる細胞または組織を同定する予備工程を含み得る。該細胞は、培養されているもの、すなわち、インビトロもしくはエキソビボでもよいし、またはインビボで対象または患者内にあってもよい。

30

【0125】

細胞または組織内のテロメラーゼ活性の増大によって実現すべき利益としては、例えば、接触させた細胞の複製能力の増強および/または寿命の延長が挙げられる。該方法は、患者の細胞または組織におけるテロメラーゼ活性の増大が望まれる対象または患者における状態の診断、例えば、細胞または組織におけるテロメラーゼ活性の増大による治療を必要とする疾病の診断をさらに含み得る。したがって、本発明は、患者の細胞または組織におけるテロメラーゼ活性の増大により、前記患者における状態を治療する方法を提供し、この方法は、そのような治療を必要とする対象に、上記 II 節に開示された式 I、II または III の化合物の有効量を投与することを含んでなる。「有効量」とは、治療成果が得られるように、患者の細胞または組織におけるテロメラーゼ活性を増大させるための有効な量を言う。

40

【0126】

このような状態には、例えば、細胞の老化に関連するか、またはテロメア反復の損失促進を導く、テロメラーゼ不在下における細胞増殖速度の増加に関連する状態が含まれる。「増殖速度の増加」とは、その細胞タイプの正常な細胞と比較して、またはその細胞タイプの他の個体内の正常な細胞と比較して、より高い細胞分裂速度を意味する。異常に早い年齢におけるそれらの細胞群の老化は、結局は疾病に至り得る(Westら、米国特許第 6,007,989 号を参照)。

50

【 0 1 2 7 】

ある一定の細胞タイプにおけるテロメラーゼ活性の増大が、有益であり得る種々の疾病状態が存在する。したがって、本発明は、患者の細胞内のテロメラーゼ活性を増大させることによる治療を必要とする対象に、上記の式 I、I I または I I I の化合物の有効量を投与することを含んでなり、患者の細胞内のテロメラーゼ活性を増大させることにより、以下から選択される状態を患者において治療する方法を提供する。幾つの場合、状態は、関連した細胞タイプ（括弧内に示されている）を用いて下記でさらに記載されているエキソビボ細胞療法による治療に供することもできる。

【 0 1 2 8 】

（ a ）アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、および脳卒中（ニューロン、グリア細胞、例えば、星状細胞、内皮細胞、線維芽細胞）、

10

（ b ）皮膚の萎縮および非薄化、もしくは弾性衰弱および皮膚のしわ皮脂腺の過形成または形成不全、老年性ほくろおよび他の色素沈着異常、白髪化および抜毛または非薄化、もしくは慢性皮膚潰瘍などの皮膚の加齢関連疾患（線維芽細胞、皮脂腺細胞、メラニン形成細胞、ケラチノサイト、ランゲルハンス細胞、微小血管内皮細胞、毛嚢細胞）、

（ c ）変性関節疾患（軟骨細胞および軟骨小腔ならびに滑膜細胞などの関節軟骨の細胞）、

（ d ）骨粗鬆症および骨格系の他の変性状態（骨芽細胞、骨髄間質細胞または間充織細胞、骨芽前駆細胞などの骨格系の細胞）、

（ e ）アテローム硬化症、カルシウム沈着、血栓形成および動脈瘤などの血管系の加齢関連およびストレス関連疾患（内皮細胞、平滑筋細胞および外膜線維芽細胞などの心血管系細胞）、

20

（ f ）加齢関連黄斑変性（色素沈着上皮細胞および血管内皮細胞などの眼細胞）

（ g ） A I D S （ H I V 制限 C D 8 ⁺ 細胞 ）；および

（ h ）自然的加齢、癌、癌療法、急性および慢性感染に伴って生じ、または細胞ターンオーバーの加速を生じる遺伝子障害に伴って生じる組織ターンオーバーの障害ならびに関連貧血および他の変性状態などの加齢関連およびストレス関連免疫系障害（ B リンパ球ならびに T リンパ球、単球、循環性および特殊化組織マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、 N K 細胞およびそれらの各々の前駆体など、リンパ系、骨髄系および赤血球系の細胞を含む免疫系の他の細胞）

30

上記の細胞タイプに加えて、テロメラーゼ活性の増大が治療的に有益であるさらなる細胞タイプとしては、限定はしないが、肝臓、内分泌腺、平滑筋系または骨格筋系の細胞が挙げられる。

【 0 1 2 9 】

一例として、 H I V 感染個体の場合、 C D 8 ⁺ 細胞は、 H I V 感染 C D 4 ⁺ 細胞濃度の制御を図る際に、 C D 8 ⁺ 細胞のターンオーバーを増大させる。 A I D S （上記（ g ）の項）において、 H I V 制限 C D 8 ⁺ 細胞の早期老化により、疾患が生じると考えられる。このような細胞の老化は、単に 1 回の細胞倍加当たりのテロメラーゼ配列損失の異常量によるだけでなく、それに加えて、複製速度が増大する結果、テロメラーの損耗が、その細胞群の通常のテロメラーゼ損耗より増大することによる。したがって、本発明は、 H I V 感染の治療を必要とする対象に、上記 I I 節に開示された式 I、I I または I I I の化合物の有効量を投与することにより、 H I V 感染対象を治療する、より具体的には、 H I V 感染対象における H I V 制限 C D 8 ⁺ 細胞の早期老化を低下させる方法を提供する。

40

【 0 1 3 0 】

テロメラーゼ活性の増大は、例えば、心不全または脳卒中における虚血など、ストレスによる細胞死に対する脆弱性増大に関連した状態において、増殖細胞と同様、非分裂細胞を益することができる（例えば、 O h および S c h n e i d e r 、 J M o l C e l l C a r d i o l 3 4 （ 7 ）： p . 7 1 7 - 2 4 ; M a t t s o n 、 E x p G e r o n t o l . 3 5 （ 4 ）： p . 4 8 9 - 5 0 2 を参照）。したがって、本発明は、ストレスまたは D N A 損傷に誘導された細胞死を減少させる治療を必要とする対象に、上記 I I 節

50

に開示された式Ⅰ、ⅠⅠまたはⅠⅠⅠの化合物の有効量を投与することを含んでなり、対象の細胞内テロメラーゼ活性の増大により、心不全または脳卒中による組織におけるストレスまたはDNA損傷に誘導された細胞死を減少させる方法を提供する。上記のとおり、該方法は、対象における指示された状態を診断する予備的工程を含み得る。

【0131】

他の態様において、患者における1つ以上の細胞タイプが限界を与えており、それらの細胞が複製を続ける能力またはストレス誘導細胞死に抵抗する能力を拡大することにより、患者の生命を延長することのできる個体の治療に該組成物が使用できる。このような細胞群の一例は、ダウン症候群の患者に存在するリンパ球である。したがって、本発明は、ダウン症候群の患者に上記ⅠⅠ節に開示された式Ⅰ、ⅠⅠまたはⅠⅠⅠの化合物の有効量を投与することを含んでなり、前記患者のリンパ球におけるテロメラーゼ活性の増大により、前記患者に存在するリンパ球の複製能を高める、および/または寿命を延長する方法を提供する。また、該組成物は、通常の老化時に生じるストレス誘導細胞死に対する抵抗性を改善するためにも使用できる。

10

【0132】

本発明のさらなる態様において、テロメラーゼ活性の増大は、創傷、火傷、擦過傷または表皮の他の急性もしくは慢性状態の治療を促進するために有効である。したがって、本発明は、表皮の急性もしくは慢性状態の治療を必要とする患者、好ましくは、その幹部に局所的に、上記ⅠⅠ節に開示された式Ⅰ、ⅠⅠまたはⅠⅠⅠの単離化合物の処方物の有効量を投与することにより、表皮の急性もしくは慢性状態を治療する方法を提供する。

20

【0133】

本明細書に用いられる「表皮の急性もしくは慢性状態」としては、創傷、火傷、擦過傷、手術切開部、ドナー移植部位における患部および感染性因子により生じた病変部ならびに、慢性静脈潰瘍、糖尿病性潰瘍、圧迫潰瘍、褥瘡、および粘膜潰瘍または糜爛などの慢性状態が挙げられる。また、永続的な炎症性状態または感染により、または遺伝子欠陥により生じた皮膚または表皮表面の病変（ケロイド形成および凝固異常など）も挙げられる。例えば、PCT国際公開第02/91999号を参照されたい。

【0134】

このような治療におけるテロメラーゼ活性増大の望ましい効果としては、治療部位における細胞増殖または細胞移動、表面の上皮形成、存在する場合は創傷の閉包、または正常な生理学的機能の回復が挙げられる。治療部位の「上皮形成」または「再上皮形成」とは、適用された療法の結果としての該部位における上皮細胞の密度増加を意味する。

30

【0135】

該方法は、移植された細胞の成長を高めるためにも使用できる。このような治療におけるテロメラーゼ活性増大の望ましい効果としては、治療部位の被覆、移植細胞の存続、免疫拒絶が無いこと、存在する場合は創傷の閉包、または正常な生理学的機能の回復が挙げられる。移植細胞は、治癒過程に直接寄与する（例えば、治癒組織の一部となる）ことによるか、または創傷を被覆し、それによって、宿主細胞による治癒を促進する環境を提供することによって、創傷閉包に寄与できる。

【0136】

本発明はまた、化粧上の向上など、他の目的のための皮膚の処置および皮膚表面における何らかの認められる欠陥の治療を考慮している。

40

【0137】

さらなる一態様において、本発明の方法および組成物は、例えば、エキソビゴ細胞療法において、またはモノクローナル抗体産生において、培養中の細胞におけるテロメラーゼ活性を増大させることにより、前記細胞の複製能力を高め、および/または前記細胞の寿命を延長させるために使用できる。テロメラーゼ活性の増大は、細胞増殖時のテロメラーゼ反復の損失を緩速化し、および/またはストレス誘導細胞死に対する抵抗性を改善することにより、このような細胞の複製能力を増大させる。

【0138】

50

エキソピボ適用の場合、上記の式Ⅰ、ⅡまたはⅢの化合物の有効量が、対象から得られた外植細胞に加えられる。「有効量」とは、該細胞内のテロメラーゼ活性を増大させ、それによって、該細胞の複製能力を増大させ、および／または該細胞の寿命を延長させるための有効な量を言う。

【0139】

外植細胞としては、例えば、骨髓幹細胞（米国特許第6,007,989号）、骨髓間質細胞（Simonsenら、Nat Biotechnol 20(6): p. 592-6、2002年）、または副腎皮質細胞（Thomasら、Nat Biotechnol 18(1): p. 39-42、2000年）などの幹細胞を挙げることができる。上記(a)～(g)項に記載されたものなどの状態もまた、エキソピボ細胞ベース療法の対象となり得る。例としては、筋ジストロフィ治療のための筋衛星細胞、骨粗鬆症治療のための骨芽細胞、加齢関連黄斑変性に対する網膜色素沈着上皮細胞、骨関節炎に対する軟骨細胞の使用が挙げられる。

【0140】

例えば、AIDS患者においては、感染したCD4⁺細胞の増大を制御する機能的CD8⁺細胞が限界を与えているという認識によって、AIDSが、最初に検出された時の早い段階で、HIV感染個体からHIV制限CD8⁺細胞を取り出し、バンクに依存し、その後、その個体に必要な利用できるCD8⁺細胞が、もはや無くなった時の後の段階で、その個体に再導入するという治療プロトコルを考案することができる。したがって、適切な時点で、個体の限界を与えている細胞の継続的投与を含むプロトコルによって、その個体の寿命を延長することができる。これらの適切な時点は、その後のCD8⁺細胞の老化により、または、それらの細胞が老化する時の1つの兆候として、このようなCD8⁺細胞内のテロメアの長さを測定することにより決定することができる。本発明により、テロメア反復の損失を緩速化する薬剤、すなわち、上記Ⅱ節に開示された式Ⅰ、ⅡまたはⅢの化合物の存在下で保存細胞の数を増加させることができる。

【0141】

したがって、本発明は、対象から細胞集団を得て、前記細胞集団をエキソピボで増加させることを含み、前記細胞集団のテロメラーゼ活性を増大させ、それによって、該細胞集団の複製能力を増大させ、および／または該細胞集団の寿命を延長させるための有効な量の上記Ⅱ節に開示された式Ⅰ、ⅡまたはⅢの化合物によって前記細胞集団が処理される、エキソピボ細胞ベース療法の方法を提供する。該方法は、対象において、エキソピボ細胞ベース療法による治療の対象となる上記の状態などの状態を診断することを一般に含む。

【0142】

さらなる一実施形態において、本発明は、前記幹細胞集団のテロメラーゼ活性を増大させ、それによって、該幹細胞集団の複製能力を増大させ、および／または該幹細胞集団の寿命を延長させるための有効な量の上記Ⅱ節に開示された式Ⅰ、ⅡまたはⅢの化合物によって前記幹細胞集団が処理される幹細胞増殖の方法を提供する。

【0143】

(VII. 投与剤形および投与方法)

本発明は、細胞内のテロメラーゼ活性を増大させ、および／または創傷治癒を促進するために有用な薬学的組成物を調製する方法を包含する。したがって、上記Ⅱ節に記載された式Ⅰ、ⅡまたはⅢの単離化合物は、製薬用賦形剤および任意に活性成分および非活性成分であり得る他の薬剤、アジュバントなどと組合わされる。該組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、徐放処方物、液剤、懸濁剤、乳剤、坐剤、クリーム、軟膏、ローション、エアロゾルなどの固体、半固体、凍結乾燥粉末または液体剤形の形態をとることができる。該処方物は、正確な用量の簡単な投与に好適な単位剤形において提供できる。

【0144】

また、式Ⅰ、ⅡまたはⅢの単離化合物は、経口投与用の食物サプリメントまたは

栄養剤として処方することもできる。栄養処方物または経口薬処方物に関して、好適な賦形剤としては、マンニトール、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、澱粉、セルロース、ゼラチン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、および/またはカルボン酸マグネシウムなどの医薬品用担体が挙げられる。経口液体処方物における使用に関して、該組成物は、例えば、生理食塩水、デキストロース水、グリセロールまたはエタノールなどの水性担体、好ましくは、水または通常の生理食塩水における水和に好適な固体または液体形態のいずれかで供給される液剤、懸濁剤、乳剤またはシロップ剤として調製できる。所望の場合、該組成物はまた、湿潤剤、乳化剤または緩衝液などの微量の非毒性補助物質を含有してもよい。式Ⅰ、ⅡまたはⅢの単離化合物はまた、*Astragalus membranaceus*の抽出エキスなどの植物抽出エキスも含み得る従来の入手できるような、既存の栄養処方物に組み込んでもよい。

10

【0145】

創傷治癒または表皮の他の急性もしくは慢性状態の治療における使用のために、式Ⅰ、ⅡまたはⅢの化合物は、局所投与用に処方される。局所適用のためのビヒクルは、種々の形態のうちの1つ、例えば、ローション、クリーム、ゲル、軟膏、スティック、スプレーまたはパスタであり得る。これらの製品形態は、周知の方法に従って処方できる。それらは、限定はしないが、溶液、エアロゾル、乳液、ゲルおよびリボソームなどの種々のタイプの担体を含み得る。該担体は、例えば、水中油基剤または油中水基剤を有する乳剤として処方できる。乳剤中に用いられる好適な疎水性（油性）成分としては、例えば、植物油、動物油脂、合成炭化水素およびそれらのポリエステルなどのエステル類およびアルコール類ならびに有機ポリシロキサン油が挙げられる。このような乳剤はまた、連続相内の不連続相を分散および懸濁させるために、乳化剤および/または界面活性剤、例えば、非イオン性界面活性剤を含んでもよい。

20

【0146】

局所処方物は、典型的に構造化剤、増粘剤またはゲル化剤および皮膚軟化剤または潤滑剤から選択される1種以上の成分を含有する。多用される構造化剤としては、ステアリルアルコールなどの長鎖アルコール類およびグリセリルエーテル類またはそれらのエステル類ならびにオリゴ（エチレンオキシド）エーテル類またはそれらのエステル類が挙げられる。増粘剤およびゲル化剤としては、例えば、アクリル酸またはメタクリル酸のポリマー類およびそれらのエステル類、ポリアクリルアミド類ならびに寒天、カラゲナン、ゼラチンおよびガーゴムなどの天然増粘剤が挙げられる。皮膚軟化剤の例として、トリグリセリドエステル類、脂肪酸エステル類およびアミド類、蜜蝋、鯨蝋、カルナウバ蝋などの蝋、レシチンなどのリン脂質、ならびにステロール類およびそれらの脂肪酸エステル類が挙げられる。該局所処方物は、当業界で公知の他の成分、例えば、収斂剤、芳香剤、色素、皮膚浸透増強剤、日焼け止めなどをさらに含んでもよい。

30

【0147】

該薬学的組成物は、非経口、経皮または吸入による投与用に処方することもできる。非経口投与のための注射用組成物は、典型的に滅菌生理食塩水などの好適なIV溶液中に活性化合物を含有する。該組成物はまた、脂質またはリン脂質中、リボソーム懸濁液中、または水性乳液中の懸濁剤として処方できる。

40

【0148】

吸入による投与のために、該活性化合物は、固体または液体のエアロゾル粒子として処方される。該処方物はまた、噴射剤および/またはエアロゾル形成を容易にするために乳糖などの分散剤を含んでもよい。経皮投与のために、選択された皮膚領域への化合物の緩徐な送達を考慮し、また脂肪族アルコール類またはグリセロールなどの浸透増強物質も含み得る経皮パッチに、該活性化合物が含まれることが好ましい。

【0149】

このような処方物を調製する方法は、当業者に公知であるか、または明らかになるう；例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences（第19版、Williams & Wilkins、1995年）を参照されたい。投与

50

される該組成物は、標的細胞または標的組織におけるテロメラーゼ活性増大のために、薬学的に安全かつ有効な量において選択された化合物量を含有する。

【0150】

該薬学的組成物または栄養剤組成物は、好ましくは、少なくとも0.1% (w/v)、好ましくは、0.1% (w/v) 超で約10% (w/v) まで、好ましくは、約5% (w/v) まで、より好ましくは、約1% (w/v) までの上記式I、IIまたはIIIの化合物を含有する。好適な濃度の選択は、該活性剤の所望の用量、送達の頻度および方法などの因子に依存する。

【0151】

哺乳動物またはヒト患者などの対象または患者の治療に関して、用量は、対象の体重および全身の健康状態、治療を受ける状態、症状の重症度などの因子に基づいて決定される。用量および濃度は、所望の利益を生み出すと同時に、望ましくない副作用を避けるように決定される。対象化合物に典型的な用量は、ヒト患者に対して、約0.5 mg/日から、500 mg/日の範囲、好ましくは、約1 mg/日から100 mg/日の範囲である。例えば、高用量療法としては、例えば、50~100 mg/日、75~100 mg/日または50~75 mg/日が挙げられ、低用量療法としては、例えば、1~50 mg/日、25~50 mg/日または1~25 mg/日が挙げられる。特定の実施形態において、例えば、本明細書において2と指定される化合物(シクロアストラゲノール)が、少なくとも1 mg/日、好ましくは少なくとも5 mg/日のレベルで投与されるか、または本明細書において1と指定される化合物(アストラガシドIV)が、少なくとも50 mg/日、好ましくは、少なくとも100 mg/日のレベルで投与される。

【0152】

本発明を支持する試験により、式I~IIIの化合物は、優れた生物学的利用能を有し、かつ低毒性であることが示されている。例えば、代表的な化合物、シクロアストラゲノール(2)は、ネズミチフス菌テスト株TA98、TA100、TA1535、TA1537および大腸菌テスト株WP2 uvrAを用いたエイムズ試験において、5000 µg/プレートのレベルまで、細菌の復帰突然変異可能性に関して陰性であった。それは、Sprague-Dawleyラットにおいて、10 mg/kgまでの単回静脈注射後、全身的に、十分に耐容された。挙動(飲食)、全体重、臓器重量(心臓、肺臓、肝臓、腎臓、副腎および脾臓)、血液学、臨床化学において、オスまたはメスに関して、有意な用量依存的变化は認められなかった。

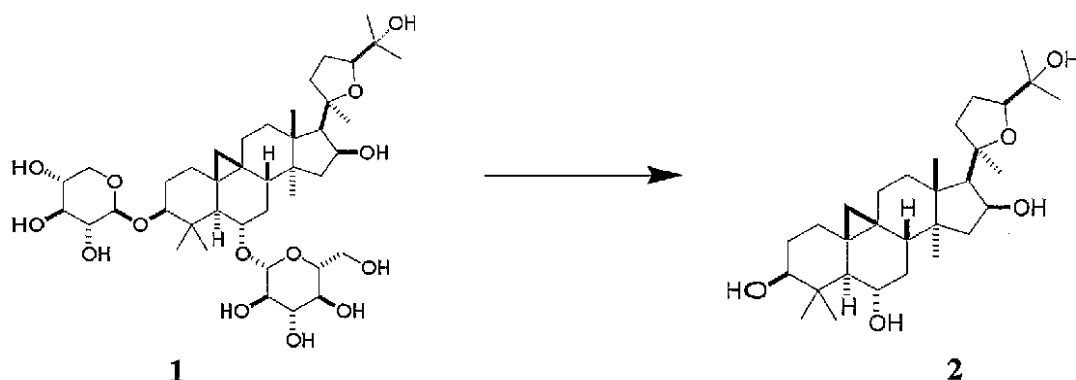
【実施例】

【0153】

(実施例1. アストラガシドIV(1)のシクロアストラゲノール(2)への変換)

【0154】

【化36】



アストラガシドIV(1) (5.00 g, mmol) に、「HCl-MeOH 10」(TCIアメリカ) (500 mL) を加え、この混合物を、室温で7日間攪拌した。反応混合物は、20 (加熱せず) で減圧下、約半分の容量に濃縮した。この混合物を、重炭

酸ナトリウム水および酢酸エチルに分配した。水層を、再度酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて、飽和塩化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィ（20：1～14：1クロロホルム/メタノール）により精製した。残渣の溶媒をエタノールに置き換えるために、精製物質をエタノールに溶解し、この溶媒を減圧留去して2（2.1 g、64%）を得た。

【0155】

【化37】

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 0.34 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 0.48 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 0.92 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.0–1.8 (m, 13H), 1.11 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.22 (s, 6H), 1.27 (s, 3H), 1.9–2.0 (m, 4H), 2.30 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 2.54 (q, $J=11.8$ Hz, 1H), 3.27 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.72 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 4.65 (q, $J=7.4$ Hz, 1H)

10

ESI-MS 正の m/z 491 ($M+H$)⁺、負の m/z 549 ($M+AcO$)⁻。TLC (Merck、Kieselgel 60) $R_f = 0.33$ (6：1クロロホルム/メタノール)。

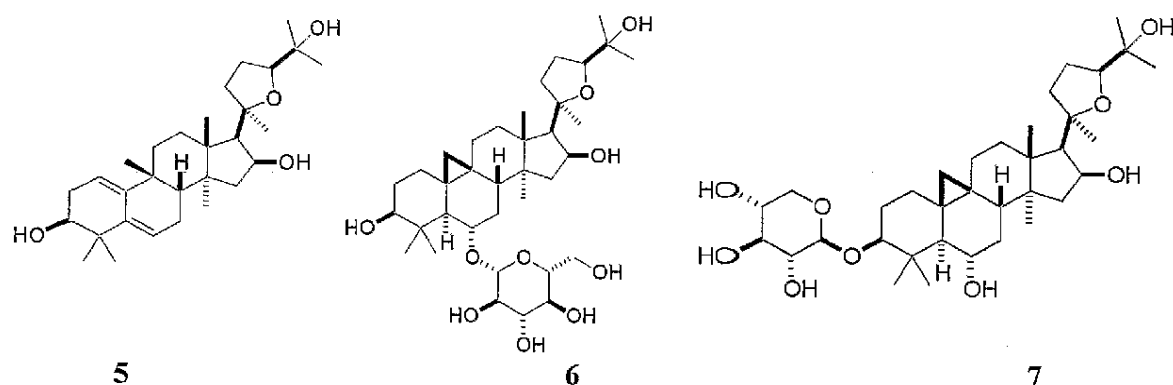
【0156】

（実施例2. アストラガロシドIV（1）から化合物5、6および7の調製：同時転移の有り無しのアストラガロシドIV（1）からグリコシドの除去）

【0157】

20

【化38】



30

アストラガロシドIV（1、1.00 g、1.28 mmol）のメタノール（80 mL）溶液に、硫酸（0.4 mL）を加え、この混合物を1.5時間還流した。室温に冷却後、この混合物を酢酸エチルおよび水に注いだ。有機層を、ブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧濃縮し、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ（20：1～10：1～7：1クロロホルム/メタノール）により精製して、転移生成物5（24 mg、4.0%）、モノグリコシド6（172 mg、21%）および7（29 mg、3.6%）ならびにアグリコン、シクロアストラゲノール（2）（326 mg、52%）を得た。

40

GRN140724：ESI-MS m/z 623 ($M+H$)⁺ $C_{35}H_{58}O_9 = 622$

GRN140725：ESI-MS m/z 653 ($M+H$)⁺ $C_{36}H_{60}O_{10} = 652$

GRN140726：ESI-MS m/z 473 ($M+H$)⁺ $C_{30}H_{48}O_4 = 472$

【0158】

【化 3 9】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.72, 0.85, 0.95, 1.05, 1.11, 1.17, 1.18, および 1.25 (s, 3H 各々), 0.9–2.1 (m, 13H), 2.20 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 2.4–2.6 (m, 2H), 3.42 (m, 1H), 3.70 (dd, $J=7.8, 5.9$ Hz, 1H), 4.63 (q, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.45 (br s, 1H), 5.57 (br s, 1H)

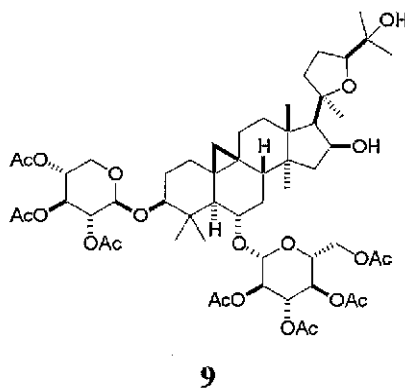
【 0 1 5 9】

(実施例 3 . 1 のアセチル化 ; 1 6 - ケトン 1 0 の形成)

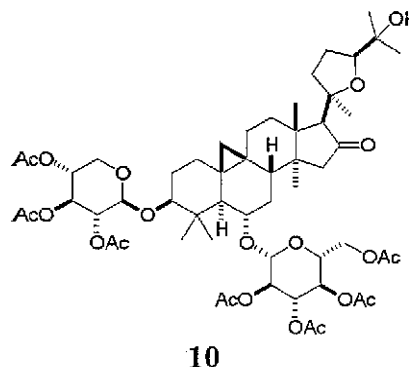
下記の化合物 9 および 1 0 は、上記に引用された 1 9 8 3 b の K i t a g a w a の方法に従って得られた。簡潔に述べると、アストラガロシド I V (1) のアセチル化により、少量の 1 6 - アセート対応物と共に 9 を得た。9 のピリジニウムクロクロメート酸化により 1 0 を得た。

【 0 1 6 0】

【化 4 0】



9



10

【 0 1 6 1】

(実施例 4 : 1 0 の脱アセチル化による 4 の調製 (図 1 を参照))

上記の 1 0 (1 0 m g 、 0 . 0 0 9 3 m m o l) のメタノール溶液に、水素化ホウ素ナトリウム (1 0 m g 、 0 . 2 6 m m o l) を加え、この混合物を、室温で一晩攪拌した。混合物をクロロホルム (3 m L) で希釈し、直接シリカゲルカラムクロマトグラフィ (3 : 1 クロロホルム / メタノール) に供し、4 (8 . 0 m g 、 定量的) を得た。

E S I - M S m/z 783 ($M+H$) $^+$ $C_{41}H_{66}O_{14} = 782$ 。

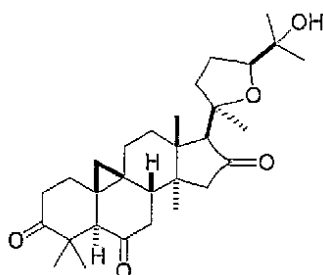
【 0 1 6 2】

(実施例 5 : シクロアストラゲノール 2 のトリオン 1 1 の形成)

シクロアストラゲノールの 3 , 6 , 1 6 - トリオン誘導体 1 1 は、K i t a g a w a ら、Chem . Pharm . Bull . 3 1 (2) : p . 6 8 9 - 6 9 7 (1 9 8 3 a) の方法により、2 の CrO_3 酸化により得られた。

【 0 1 6 3】

【化 4 1】



11

10

20

30

40

50

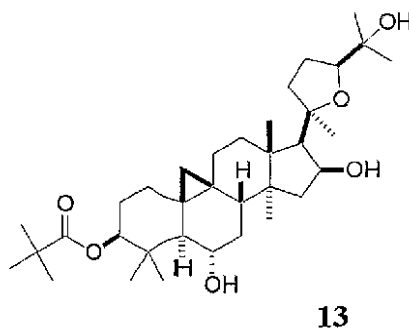
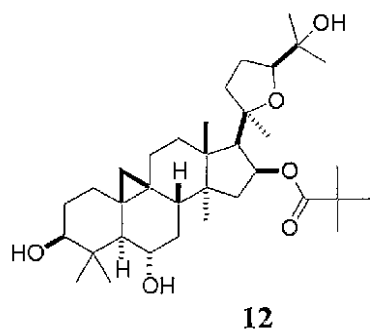
。

【 0 1 6 4 】

(実施例 6 . シクロアストラゲノール (2) の 3 - または 6 - ヒドロキシ基のアシル化)

【 0 1 6 5 】

【 化 4 2 】



10

シクロアストラゲノール (2) (5 0 m g 、 0 . 1 0 m m o l) のジクロロメタン (5 m L) 溶液に、トリエチルアミン (0 . 0 3 0 m L 、 0 . 2 2 m m o l) および塩化ピバロイル (0 . 0 1 4 m L 、 0 . 1 2 m m o l) を加え、この混合物を 0 で一晩攪拌した。この混合物を、直接シリカゲルカラムクロマトグラフィ (1 : 1 ~ 1 : 2 ヘキサン / 酢酸エチル) に供し、1 2 (1 7 m g 、 3 0 %) および 1 3 (3 . 3 m g 、 2 . 9 %) を得た。

20

1 2 : E S I - M S m / z 5 7 5 (M + H) ⁺ C _{3 5} H _{5 8} O ₆ = 5 7 4 。

【 0 1 6 6 】

【 化 4 3 】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

0.32 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 0.49 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 0.92 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.1–2.0 (m, 17H), 1.15 (s, 9H), 1.18 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.34 (s, 6H), 2.19 (dd, J = 13.7, 9.8 Hz, 1H), 2.36 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.27 (m, 1H), 3.51 (td, J = 9.4, 3.5 Hz, 1H), 3.71 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 5.32 (td, J = 7.8, 4.7 Hz, 1H)

30

1 3 : E S I - M S m / z 5 7 5 (M + H) ⁺ C _{3 5} H _{5 8} O ₆ = 5 7 4 。

【 0 1 6 7 】

【 化 4 4 】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

0.35 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 0.51 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 0.92 (s, 3H), 1.0–2.0 (m, 17H), 1.03 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.17 (s, 9H), 1.21 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 2.29 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 2.53 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.73 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.50 (dd, J = 10.9, 4.3 Hz, 1H), 4.65 (m, 1H)

40

。

【 0 1 6 8 】

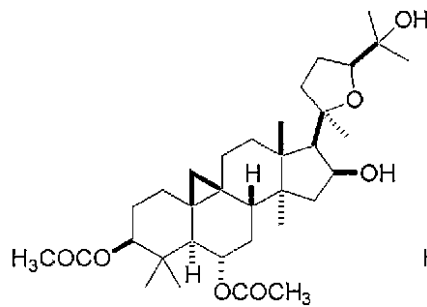
(実施例 7 A . シクロアストラゲノール (2) の第二級ヒドロキシ基のアセチル化)

本反応は、上記に引用された K i t a g a w a 1 9 8 3 a の方法に従って実施された。簡潔に述べると、無水酢酸 / ピリジンによるアセチル化により、1 4 (主生成物) および 1 5 (副生成物) の混合物を得た。

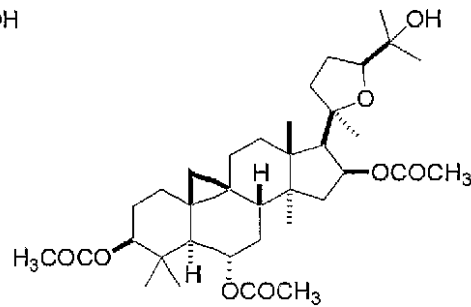
50

【 0 1 6 9 】

【 化 4 5 】



14



15

10

。

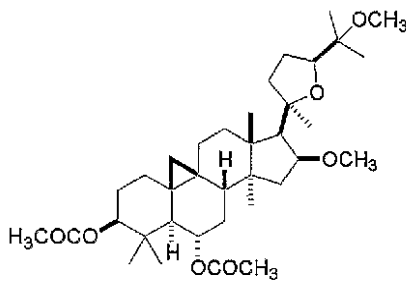
【 0 1 7 0 】

(実施例 7 B . アセチル基を保持したまま 3 , 6 - ジアセチルシクロアストラゲノール (1 4) のメチル化)

【 0 1 7 1 】

【 化 4 6 】

20



16

1 4 (3 0 m g 、 0 . 0 5 2 m m o l) のジメチルホルムアミド (3 m L) 溶液に、窒素下、ヨードメタン (0 . 7 5 m L 、 1 2 m m o l) および水素化ナトリウム (6 0 % 油分散、 4 0 m g 、 1 . 0 m m o l) を 0 で加え、この混合物を室温で一晩攪拌した。水を加え、混合物を、酢酸エチルで抽出した。有機層を、水とブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (4 : 1 ヘキサン / 酢酸エチル) により精製し、化合物 1 6 (2 9 m g 、 9 2 %) を得た。

30

。

E S I - M S m / z 6 0 3 (M + H) ⁺ C _{3 6} H _{5 8} O ₇ = 6 0 2 。

【 0 1 7 2 】

【 化 4 7 】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.33 (d ,

40

J = 4.7 Hz, 1H), 0.56 (d , *J* = 4.7 Hz, 1H), 0.82 (s , 3H), 0.89 (s , 3H), 0.96 (s , 3H), 1.06 (s , 3H), 1.1–1.9 (m , 17H), 1.13 (s , 3H), 1.19 (s , 3H), 1.23 (s , 3H), 1.97 (s , 3H), 2.02 (s , 3H), 2.3–2.4 (m , 2H), 3.05 (s , 3H), 3.23 (s , 3H), 3.81 (dd , *J* = 9.0, 6.6 Hz, 1H), 3.95 (td , *J* = 7.8, 5.1 Hz, 1H), 4.54 (dd , *J* = 10.9, 4.7 Hz, 1H), 4.70 (td , *J* = 9.4, 4.3 Hz, 1H)

。

【 0 1 7 3 】

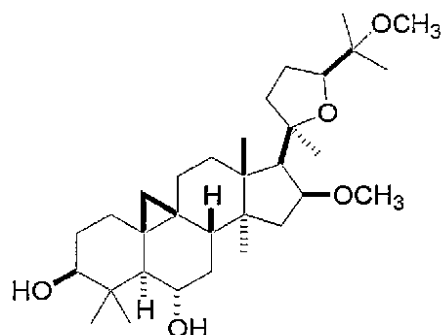
(実施例 7 C . 1 6 , 2 5 - ジメトキシシクロアストラゲノール、 1 7 の調製 : 1 6 か

50

らアセチル基の除去)

【0174】

【化48】



17

16 (28 mg, 0.046 mmol) およびナトリウムメトキシド (メタノール中 0.5 mol/L, 6 mL) の混合物を、室温で 48 時間攪拌した。水を加え、混合物を、酢酸エチルで抽出した。有機層を、水とブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (2:3 ヘキサン/酢酸エチル) により精製し、ジメトキシジオール化合物 17 (23 mg, 96%) を得た。

ESI-MS m/z 519 ($M+H$)⁺ $C_{32}H_{54}O_5 = 518$ 。

【0175】

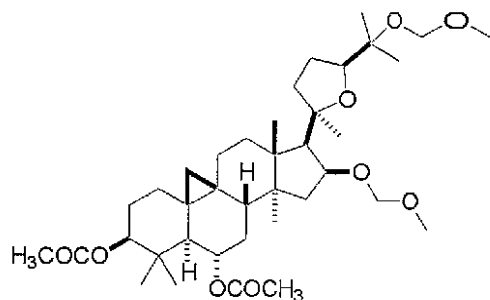
【化49】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.32 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 0.47 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.1–1.9 (m, 17H), 1.13 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 2.3–2.4 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 3.27 (m, 1H), 3.51 (td, $J=9.4, 3.5$ Hz, 1H), 3.81 (dd, $J=9.4, 6.6$ Hz, 1H), 3.96 (td, $J=7.8, 5.5$ Hz, 1H)

(実施例 7D: アセチル基を保持したまま 3, 6 - ジアセチルシクロアストラゲノール (14) のアルキル化)

【0176】

【化50】



18

14 (109 mg, 0.190 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に、ジイソプロピルエチルアミン (1.0 mL) およびクロロメチルメチルエーテル (0.5 mL) を加え、この混合物を室温で 24 時間攪拌した。水を加え、混合物を、酢酸エチルで抽

10

20

30

40

50

出した。有機層を、水とブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ（3：1ヘキサン／酢酸エチル）により精製し、化合物18（114mg、90％）を得た。

【0177】

【化51】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.31 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 0.56 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 0.80 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.1–2.0 (m, 18H), 1.15 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.28 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.81 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.5–4.6 (m, 3H), 4.7–4.8 (m, 3H)

10

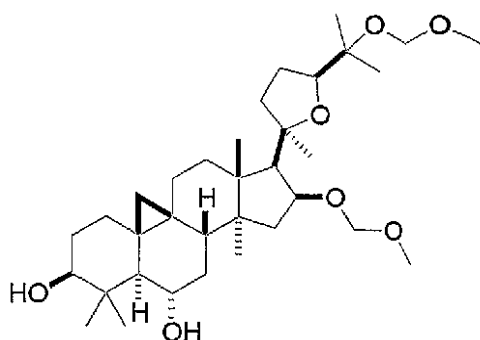
。

【0178】

（実施例7E．18からアセチル基の除去）

【0179】

【化52】



19

20

上記（シクロアストラゲノールの3，6 - ジアセチル - 16，25 - ジ（メトキシメチル）エーテル誘導体）18（102mg、0.150mmol）およびナトリウムメトキシド（メタノール中0.5mol/L、10mL）を、室温で48時間攪拌した。水を加え、混合物を、酢酸エチルで抽出した。有機層を、水とブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ（1：1ヘキサン／酢酸エチル）により精製し、ジ（メトキシメチル）エーテル化合物19（80mg、92％）を得た。

30

ESI - MS m/z 579 ($M+H$)⁺ $C_{34}H_{58}O_7 = 578$ 。

【0180】

【化53】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.32 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 0.48 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 0.89 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.1–2.0 (m, 18H), 1.15 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 2.29 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.53 (m, 1H), 3.81 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 4.18 (td, $J=7.8, 5.5$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 4.76 (d, $J=7.4$ Hz, 1H)

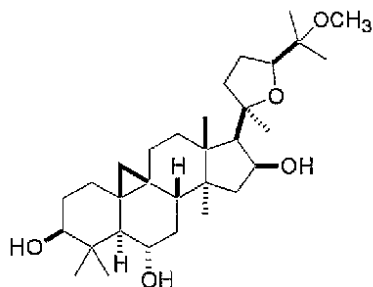
40

。

【0181】

50

【化 5 4】



10

20

ESI - MS m/z 505 ($M+H$)⁺ $C_{31}H_{52}O_5 = 504$.

【化 5 5】

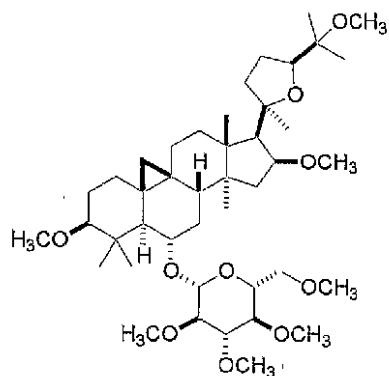
30

○

40

【 0 1 8 6 】

【化 5 6】

**21**

6 (50 mg、0.077 mmol) のジメチルホルムアミド (4 mL) 溶液に、窒素下、ヨードメタン (1.0 mL、16 mmol) および水素化ナトリウム (60% 油分散、60 mg、1.5 mmol) を 0 で加え、この混合物を室温で一晩攪拌した。水を加え、混合物を、酢酸エチルで抽出した。有機層を、水とブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (3 : 1 ヘキサン / 酢酸エチル) により精製してペルメトキシ化合物 21 (33 mg、57%) を得た。

ESI - MS m/z 751 ($M + H$)⁺ $C_{43}H_{74}O_{10} = 750$ 。

【0187】

【化 5 7】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.21

(d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 0.47 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 0.8–2.0 (m, 17H), 0.87 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 2.3–2.4 (m, 2H), 2.67 (dd, $J = 11.0, 4.1$ Hz, 1H), 2.92 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 3.1–3.6 (m, 6H), 3.22 (s, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.80 (dd, $J = 9.0, 6.6$ Hz, 1H), 3.94 (m, 1H), 4.24 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H)

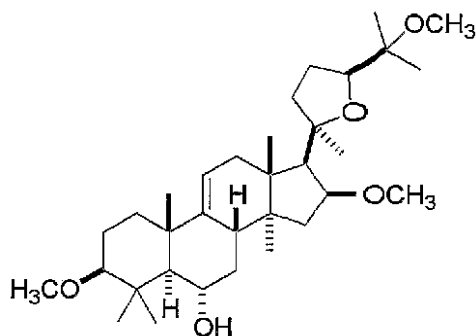
。

【0188】

(実施例 9B. 3, 16, 25 - トリメトキシアストラゲノール、22 の調製：同時転移を伴うペルメトキシ化合物 21 からグリコシドの除去)

【0189】

【化 5 8】

**22**

21 (30 mg、0.040 mmol) のメタノール (10 mL) 溶液に、硫酸 (0.2 mL) を加え、この混合物を 10 時間還流した。水を加え、混合物を、酢酸エチルで抽

10

20

30

40

50

出した。有機層を、水とブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ（４：１ヘキサン／酢酸エチル）により精製して２２（３．６ｍｇ、１７％）を得た。

E S I - M S m / z 533 (M + H)⁺ C₃₃H₅₆O₅ = 532。

【 0 1 9 0 】

【 化 5 9 】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.73 (s, 3H), 0.8–2.0 (m, 18H), 0.85 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 2.3–2.4 (m, 2H), 2.58 (dd, *J* = 10.9, 3.9 Hz, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.80 (dd, *J* = 9.4, 6.6 Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 5.25 (br d, *J* = 5.5 Hz, 1H)

10

。

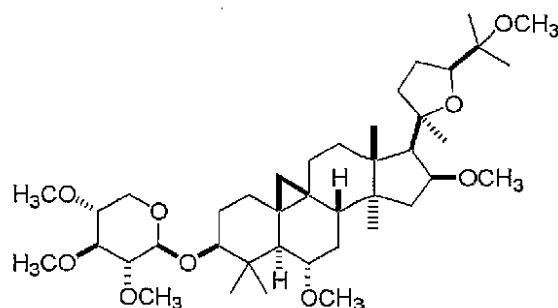
【 0 1 9 1 】

（実施例 10A：シクロアストラゲノールモノグリコシド 7 の遊離ヒドロキシルのアルキル化）

【 0 1 9 2 】

【 化 6 0 】

20



23

化合物 23（１８ｍｇ、５３％）を、上記化合物 21 の調製のために用いられた手法に従って 7（３０ｍｇ）から得た。

E S I - M S m / z 707 (M + H)⁺ C₄₁H₇₀O₉ = 706。

【 0 1 9 3 】

【 化 6 1 】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.20 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 0.44 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 0.8–1.9 (m, 17H), 0.90 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 2.3–2.4 (m, 2H), 2.9–3.6 (m, 6H), 3.09 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.80 (dd, *J* = 9.0, 6.6 Hz, 1H), 3.9–4.0 (m, 2H), 4.21 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H).

40

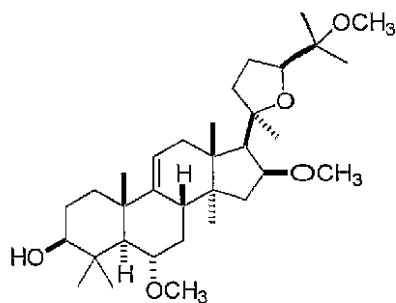
。

【 0 1 9 4 】

（実施例 10B：6, 16, 25 - トリメトキシアストラゲノール、24 の調製：同時転移を伴うペルメトキシ化合物 23 からグリコシドの除去）

【 0 1 9 5 】

【化 6 2】



24

10

。

【 0 1 9 6 】

化合物 24 (7 . 1 m g 、 5 6 %) を、上記化合物 22 の調製のために用いられた手法に従って 23 (1 7 m g) から得た。

E S I - M S m / z 5 3 3 (M + H) ⁺ C ₃₃ H ₅₆ O ₅ = 5 3 2。

【 0 1 9 7 】

【化 6 3】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.74 (s,

3H), 0.8–2.4 (m, 18H), 0.85 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 3.18 (m, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.53 (m, 1H), 3.80 (dd, *J* = 9.4, 6.6 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 5.24 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H)

20

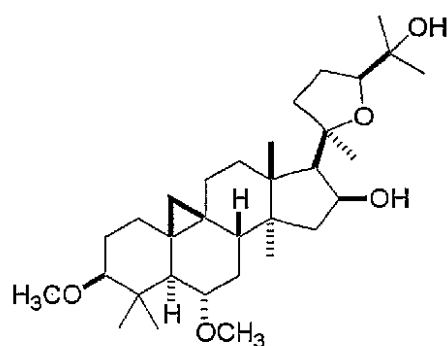
。

【 0 1 9 8 】

(実施例 1 1 . 3 , 6 - ジメトキシシクロアストラゲノール 25 の調製 : ジ (メトキシメチル) エーテル基の除去を伴う 16 , 25 - ジ (メトキシメチル) エーテル化合物 19 のメチル化)

【 0 1 9 9 】

【化 6 4】



25

30

40

。

【 0 2 0 0 】

19 (30 m g 、 0 . 0 5 2 m m o l) のジメチルホルムアミド (3 m L) 溶液に、窒素下、ヨードメタン (0 . 7 5 m L 、 1 2 m m o l) および水素化ナトリウム (60 % 油分散、40 m g 、 1 . 0 m m o l) を 0 で加え、この混合物を室温で一晩攪拌した。水を加え、混合物を、酢酸エチルで抽出した。有機層を、水とブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した。

【 0 2 0 1 】

50

この残渣に、テトラヒドロフラン (5 m L) および 1 0 % 塩酸 (1 m L) を加え、この混合物を室温で一晩攪拌してから 1 時間還流した。水を加え、混合物を、酢酸エチルで抽出した。有機層を、水とブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (3 : 1 ~ 1 : 1 ヘキサン / 酢酸エチル) により精製し、25 (13 m g、48 %) および少量 (7 . 4 m g、25 %) の 3 , 6 - ジメトキシ - 16 - (メトキシメチル) エーテル化合物 26 を得た。

25 : E S I - M S m / z 563 (M + H) ⁺ C₃₄H₅₈O₆ = 562。

【 0 2 0 2 】

【 化 6 5 】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

0.19 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 0.45 (*J* = 4.3 Hz, 1H), 0.8–2.3 (m, 18H), 0.86 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 2.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 2.70 (dd, *J* = 11.1, 4.5 Hz, 1H), 2.90 (m, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.326 (s, 3H), 3.330 (s, 3H), 3.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.53 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H)

26 : E S I - M S m / z 519 (M + H) ⁺ C₃₂H₅₄O₅ = 518。

【 0 2 0 3 】

【 化 6 6 】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

0.21 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 0.45 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 0.8–2.0 (m, 17H), 0.86 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 2.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 2.54 (q, *J* = 10.2 Hz, 1H), 2.69 (dd, *J* = 11.3, 4.3 Hz, 1H), 2.89 (td, *J* = 8.2, 4.3 Hz, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.72 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.66 (m, 1H).

。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 0 4 】

【 図 1 - 1 】 図 1 A ~ H は、本明細書に記載された方法および組成物に使用するための例示的化合物の構造を示している。

【 図 1 - 2 】 図 1 A ~ H は、本明細書に記載された方法および組成物に使用するための例示的化合物の構造を示している。

【 図 2 】 図 2 は、T R A P アッセイで測定した時の、2 (シクロアストラゲノール) で処理した新生児ケラチノサイトにおけるテロメラーゼ活性の増大を示している。

【 図 3 】 図 3 は、T R A P アッセイで測定した時の、E G F (10 n M) および溶媒コントロールと比較した、1 (アストラガロシド I V) による新生児ケラチノサイトにおけるテロメラーゼ活性の増大を示している。

【 図 4 】 図 4 は、「スクラッチアッセイ」で測定した時の老齢の成人ケラチノサイトにおける 1 (アストラガロシド I V) による創傷治癒活性を示す一連のコンピュータ作成画像である。

【 図 5 】 図 5 は、幼若新生児ケラチノサイトにおける、1 (アストラガロシド I V) および 2 (シクロアストラゲノール) の創傷治癒活性を示す一連のコンピュータ作成画像である。

【 図 6 】 図 6 は、老化ケラチノサイト単独およびテロメラーゼ阻害オリゴヌクレオチド (G R N 163) またはコントロールオリゴヌクレオチド (G R N 137227) の存在下での老化ケラチノサイトにおける 1 (アストラガロシド I V) の創傷治癒活性を示す一連

10

20

30

40

50

のコンピュータ作成画像である。

【図7】図7は、テロメラゼ阻害剤GRN163の存在下および不在下における、また約2 nM PDGF（血小板由来因子）と比較した、老化新生児ケラチノサイトにおける1（アストラガロシドIV）の創傷治癒活性を示すグラフである。

【図1-1】

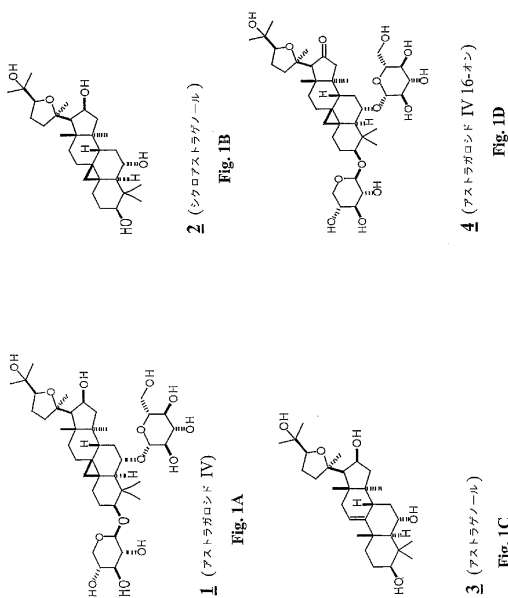


Fig. 1

【図1-2】

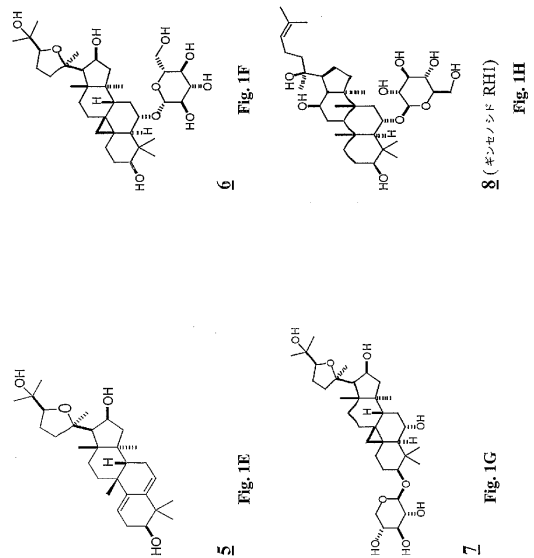


Fig. 1 続き

【図 2】

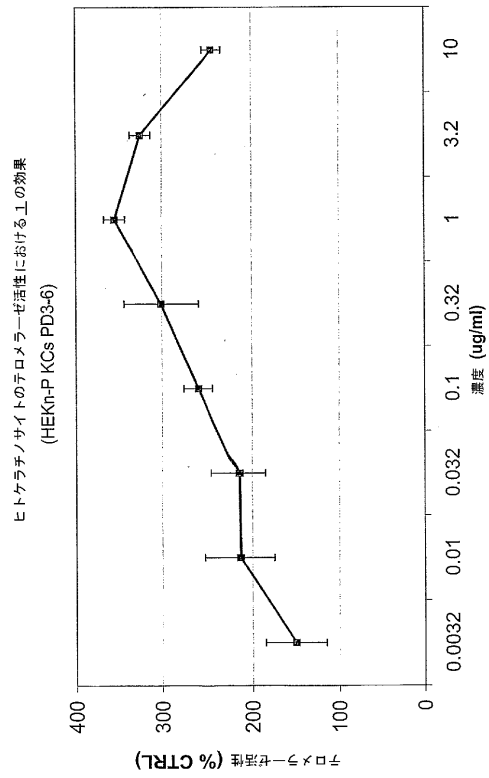


Fig. 2

【図 3】

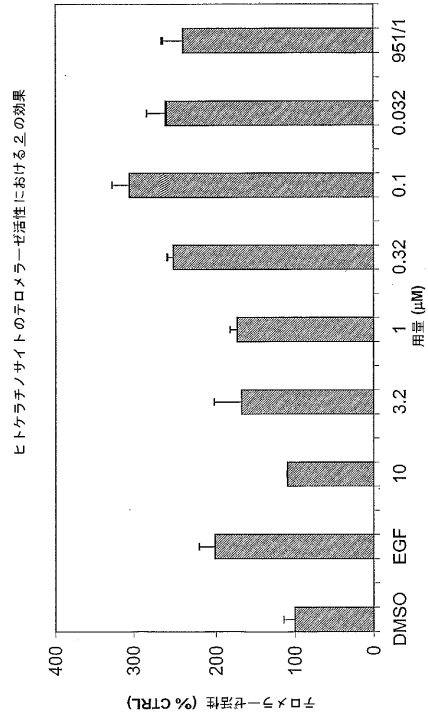


Fig. 3

【図 7】

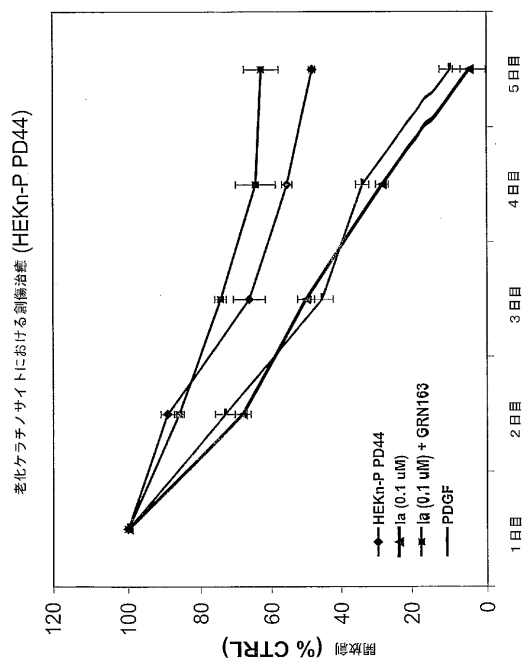


Fig. 7

【図 4】

高齢の成人ケラチノサイトにおける創傷治癒の促進

(HEKa18, PD32)

コントロール

1日目

2日目

3日目

4日目

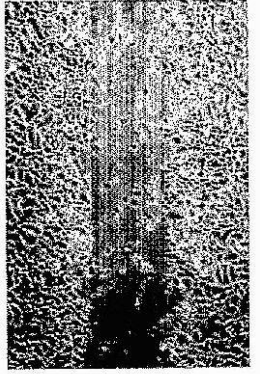
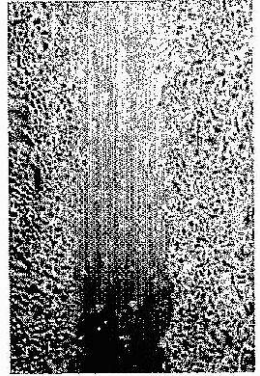
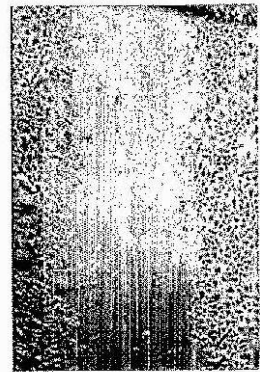
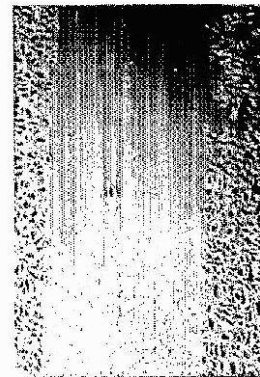
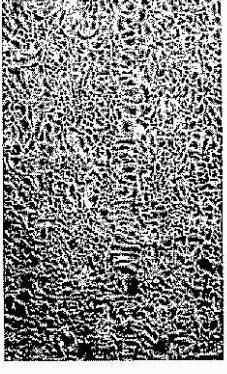
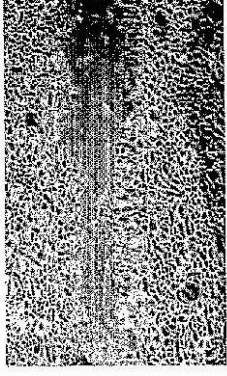
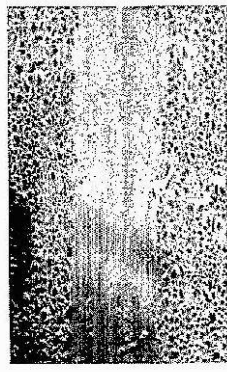
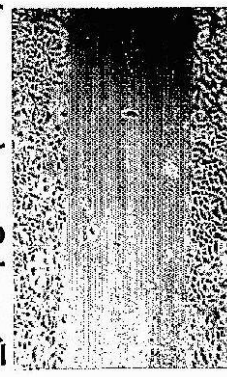
1, 0.1 μ g/ml (130 nM)

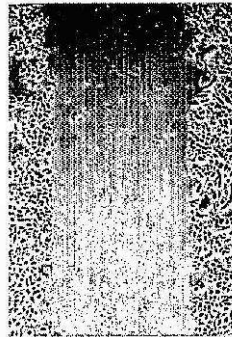
Fig. 4

【図 5】

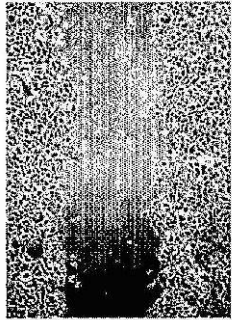
幼若のケラチノサイトにおける創傷治癒の促進 (HEKn-P, PD14)

コントロール

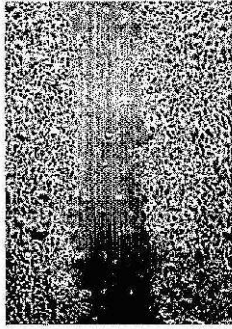
1日目



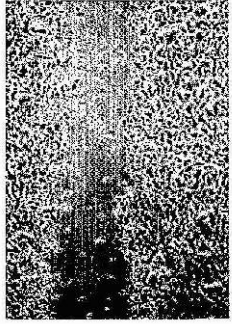
2日目



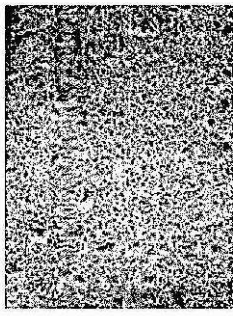
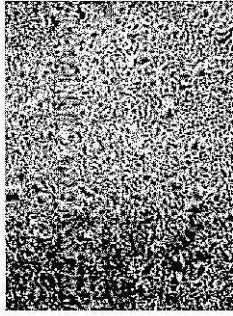
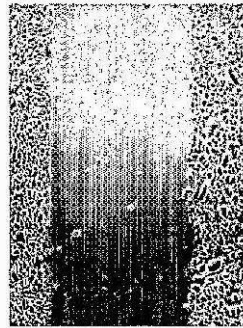
3日目



4日目



1, 12.7 nM



2, 10 nM

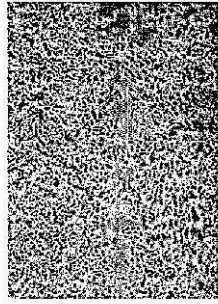
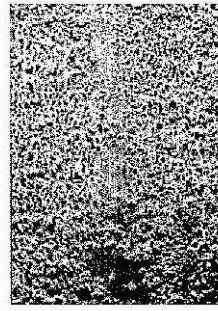
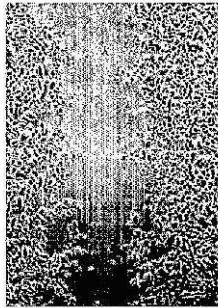
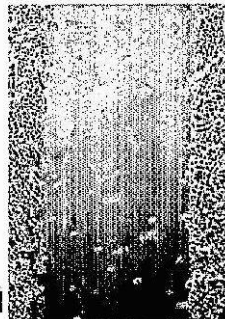


Fig. 5

【図 6】

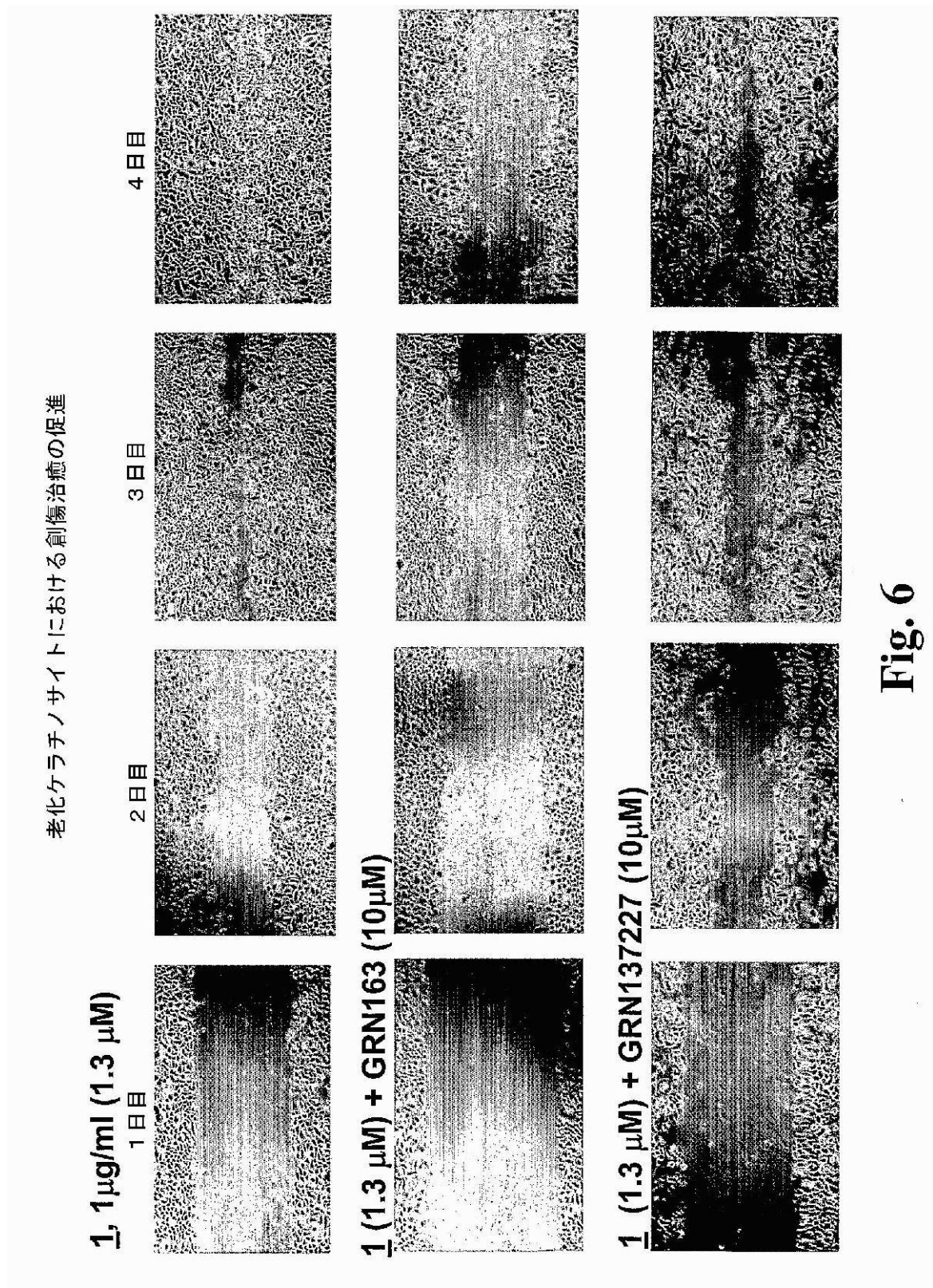


Fig. 6

【配列表】

0005583882000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	36/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/78	X
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/02	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/25	(2006.01)	C 1 2 Q	1/25	

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ハーレイ, カルビン ビー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 1, パロ アルト, ユニバーシティ アベニュー
1 7 3 0

(72)発明者 チン, アリソン シー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 5, スタンフォード, キャンパス ドライブ
ースト 1 0 6 0

(72)発明者 赤間 勉

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 7, サニーベール, アズール ストリート 8 3
2

(72)発明者 イップ, ナンシー ユック-ユ

香港 クーロン, リパルス ベイ ロード 1 1 9 エー, リパルス ベイ タワーズ, アパ
ートメント 7 エー

(72)発明者 ウォン, ユン-ホウ

香港 クーロン, シニア スタッフ クォーターズ, タワー 6, フラット 7 ビー

(72)発明者 ミラー-マルティニ, デーヴィッド エム.

香港 クーロン, シニア スタッフ クォーターズ, タワー 1 1, フラット 1 エー

合議体

審判長 星野 紹英

審判官 中島 庸子

審判官 松浦 新司

(56)参考文献 特開平 1 0 - 3 6 3 8 8 号公報

国際公開第 0 2 / 0 7 7 3 2 号

国際公開第 0 1 / 0 0 1 9 9 6 号

特表平 8 - 5 1 0 4 7 4 号公報

特開 2 0 0 3 - 8 9 6 8 7 号公報

特開昭 6 2 - 1 2 7 9 1 号公報

特開 2 0 0 0 - 2 2 9 8 2 7 号公報

特開2000-204091号公報

特開2000-229834号公報

Planta Medica, 1994, 60(3), p. 240 - 243

Chemical & pharmaceutical bulletin, 1983, 31(2), p. 689 - 697

Chemical & pharmaceutical bulletin, 1983, 31(2), p. 698 - 708

Chemical & pharmaceutical bulletin, 1983, 31(2), p. 709 - 715

Pharmazie, 1993, 48(6), p. 452 - 454

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07J17/00, A61K31/58-31/7048, A61K35/78, A61P1/00-43/00, A23L1/30, C12N15/00, C12Q1/02-1/25

REGISTRY(STN), CAPLUS(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)