



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0089887  
(43) 공개일자 2011년08월09일

(51) Int. Cl.

*C07J 3/00* (2006.01) *A61K 31/565* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7017367(분할)

(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년06월23일

심사청구일자 2011년07월22일

(62) 원출원 특허 10-2005-7024720

원출원일자(국제출원일자) 2004년06월23일

심사청구일자 2009년06월10일

(85) 번역문제출일자 2011년07월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/020277

(87) 국제공개번호 WO 2005/000245

국제공개일자 2005년01월06일

(30) 우선권주장

60/480,988 2003년06월23일 미국(US)

(71) 출원인

제론 코퍼레이션

미국 캘리포니아주 멘로 파크 콘스티튜션 드라이브 230

(72) 발명자

할리 켈빈 비.

미합중국 캘리포니아 94301 팔로 알토 유니버시티 애비뉴 1730

친 앨리스 씨.

미합중국 캘리포니아 94305 스탠포드 캠퍼스 드라이브 이스트1060

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정삼영

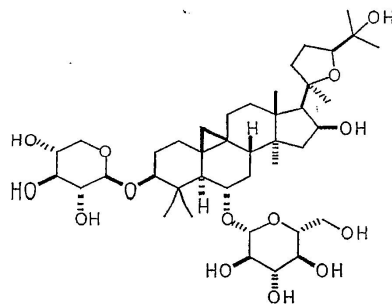
전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 텔로머라제 활성을 증가시키기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 이러한 조성물은 국소를 포함하는 약학적 및 기능식품 제형을 포함한다. 방법 및 조성물은 예를 들어, HIV 감염, 각종 퇴행성 질병, 및 급성 또는 만성 피부병과 같은 환자의 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성의 증가에 의한 치료를 받는 질병을 치료하기에 유용하다. 그들은 또한 생체 외 세포 치료와 같은 배양 중 세포의 복제 역량 및 줄기 세포 증식을 향상시키는 데 유용하다.

대표도 - 도1a



1 (아스트라갈로시드 IV)

(72) 발명자

**아카마 츠토무**

미합중국 캘리포니아 94087 서니베일 아쥬어 스트리트 832

**아이피 낸시 욱유**

중국 홍콩특별행정구 코울룬 리펄스 베이 로드 11 9에이 아파트 7에이 리펄스 베이 타워

**왕영호**

중국 홍콩특별행정구 코울룬 플랫 7비 타워 6 시니어 스태프쿼터스

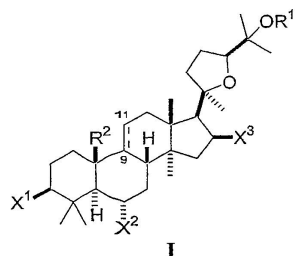
**밀러-마티니 데이비드 엠.**

중국 홍콩특별행정구 코울룬 플랫 1에이 타워 11 시니어 스태프쿼터스

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 세포 또는 조직을 동정하는 단계, 및 상기 세포 또는 조직을 화학식 I의 단리 화합물의 제형으로 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키는 방법.



[상기식에서,

각각의  $X^1$ ,  $X^2$ , 및  $X^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되고;

$OR^1$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되며;

상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함하고; 및

$R^2$ 는 메틸이고  $\equiv$ 는 탄소 9 및 11 사이의 이중 결합을 나타내며; 또는,  $R^2$ 는 탄소 9와 함께 융합된 시클로프로필 고리를 형성하고,  $\equiv$ 는 탄소 9 및 11 사이의 단일 결합을 나타냄].

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 화합물은 0, 1, 또는 2개의 글리코시드를 포함하며, 이들 중 어느 것도 추가적 글리코시드로 치환되지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,  $R^2$ 는 9 탄소와 함께 융합 시클로프로필을 형성하며,  $\equiv$ 는 탄소 9 내지 11 사이의 단일 결합을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서,  $X^1$ 은 OH 또는 1개의 글리코시드이며, 각각의  $X^2$  및  $OR^1$ 은 독립적으로 OH 또는 1개의 글리코시드이며,  $X^3$ 는 OH 또는 케토인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 아스트라갈로시드 IV 16-온, 시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드, 및 시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피르노시드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

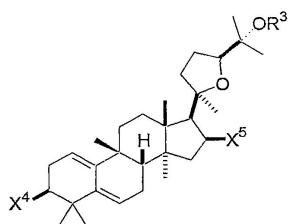
제 5 항에 있어서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 및 아스트라갈로시드 IV 16-온으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 화합물은 아스트라갈로시드 IV인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 8

텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 세포 또는 조직을 동정하는 단계, 및 상기 세포 또는 조직을 화학식 II의 단리 화합물의 제형과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키는 방법.



II

[상기식에서,

각각의  $X^4$  및  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고,

$OR^3$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되며, 여기서 상기 글리코시드 상의 히드록실 기는 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 추가적으로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함함].

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서, 각각의  $X^4$  및  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되고,  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토(=O)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

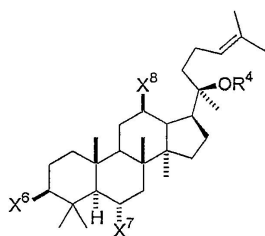
제 8 항에 있어서,  $X^4$ 는 OH 또는 1개의 글리코시드이며, 각각의  $X^5$  및  $OR^3$ 는 OH인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

제 10 항에 있어서,  $X^4$ 는 OH인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 12

텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 세포 또는 조직을 동정하는 단계, 및 상기 세포 또는 조직을 화학식 III의 단리 화합물의 제형으로 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키는 방법.



III

[상기식에서,

각각의  $X^6$ ,  $X^7$ , 및  $X^8$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고,

$OR^4$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되고,

상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 추가적으로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함함].

### 청구항 13

제 12 항에 있어서, 각각의  $X^6$ ,  $X^7$ ,  $X^8$  및  $OR^4$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 14

제 13 항에 있어서, 각각의  $OR^4$ ,  $X^6$  및  $X^8$ 은 OH이고,  $X^7$ 은 1개의 글리코시드인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 15

제 14 항에 있어서, 화합물은 진세노사이드 RH1인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 16

제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 단리 화합물의 유효량의 제형을 이러한 치료가 필요한 환자에 투여하는 것을 포함하는 상기 환자의 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시킴으로써 환자의 상태를 치료하는 방법.

### 청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 단리 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 18

제 16 항에 있어서, 상기 상태는 HIV 감염 또는 퇴행성 질병인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 19

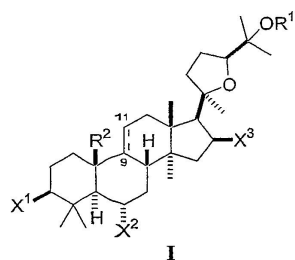
제 16 항에 있어서, 상기 퇴행성 질병은 신경변성 질병, 뼈 또는 관절의 퇴행성 질병, 시력 감퇴, 죽상경화증, 및 빈혈로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 20

제 16 항에 있어서, 상기 상태는 상처 또는 표피의 기타 급성 또는 만성 상태인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 21

약학적으로 허용가능한 비히클에 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학적 조성물.



[상기식에서,

각각의  $X^1$  및  $X^2$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고;

$X^3$ 는 케토이며;

$OR^1$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되는데;

상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 추가적 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함하고;

$R^2$ 는 메틸이며  $\equiv$ 는 탄소 9 내지 11 사이의 이중 결합을 나타내며; 또는,  $R^2$ 는 탄소 9와 함께 융합 시클로프로필 고리를 형성하고;  $\equiv$ 는 탄소 9 내지 11 사이의 단일 결합을 나타냄].

#### 청구항 22

제 21 항에 있어서,  $R^2$ 는 탄소 9와 함께, 융합 시클로 고리를 형성하며;  $\equiv$ 는 탄소 9 및 11 사이의 단일 결합을 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 23

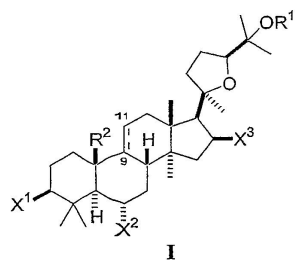
제 21 항에 있어서,  $X^1$ 은 OH 또는 1개의 글리코시드이며, 각각의  $X^2$  및  $OR^1$ 은 독립적으로 OH 또는 글리코시드인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 24

제 21 항에 있어서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV 16-온인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 25

약학적으로 허용가능한 비히클에 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학적 조성물.



[상기식에서,

각각의  $X^1$  및  $X^2$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토로부터 선택되고 나머지는 1개의 글리코시드이며;

각각의  $X_3$  및  $OR^1$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고;

상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 추가적인 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함하며;

$R^2$ 는 메틸이며  $\equiv$ 는 탄소 9 내지 11 사이의 이중 결합을 나타내며; 또는,  $R^2$ 는 탄소 9와 함께 융합 시클로프로필 고리를 형성하고;  $\equiv$ 는 탄소 9 내지 11 사이의 단일 결합을 나타냄].

#### 청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 화합물은 1개의 글리코시드를 포함하는데, 이것은 추가적 글리코시드로 치환되지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 27

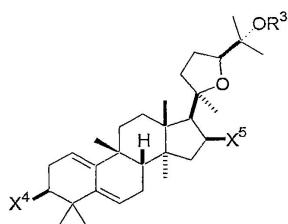
제 25 항에 있어서,  $R^2$ 는 탄소 9와 함께, 융합 시클로프로필 고리를 형성하며;  $\equiv$ 는 탄소 9 및 11 사이의 단일 결합을 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 28

제 25 항에 있어서, 상기 화합물은 시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드(본원에서 6으로 칭해짐) 및 시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드(본원에서 7로 칭해짐)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 29

약학적으로 허용가능한 비히클에 화학식 II의 화합물을 포함하는 약학적 조성물.



II

[상기식에서,

각각의  $X^4$  및  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고,

$OR^3$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되며,

상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 추가적으로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함함].

#### 청구항 30

제 29 항에 있어서, 각각의  $X^4$  및  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 글리코시드로부터 선택되고,  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토(=O)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 31

제 30 항에 있어서,  $X^4$ 는 OH 또는 1개의 글리코시드이며, 각각의  $X^5$  및  $OR^3$ 는 OH인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 32

표피 세포를 제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 단리 화합물의 국소적 제형과 접촉시키는 단계를 포함하는 표피의 급성 또는 만성 상태를 치료하는 방법.

#### 청구항 33

제 32 항에 있어서, 상기 단리 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 34

제 32 항에 있어서, 상기 급성 또는 만성 상태는 상처, 화상, 찰과상, 절개, 이식 부위, 감염성 제제에 의해 야기된 손상, 만성 정맥 궤양, 당뇨 궤양, 압박 궤양, 욕창, 점막 통증, 및 켈로이드 형성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 35

제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 단리 화합물의 국소 제형을 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 36

제 35 항에 있어서, 상기 단리 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 37

제 35 항에 있어서, 상기 화합물은 적어도 0.1%(w/v)의 농도로 상기 제형에 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 38

세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시킴에 의한 치료를 받는 질병을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 단리 화합물의 사용.

#### 청구항 39

제 38 항에 있어서, 상기 질병은 HIV 감염 또는 퇴행성 질병인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 40

제 39 항에 있어서, 상기 질병은 HIV 감염인 것을 특징으로 하는 사용.

#### 청구항 41

제 39 항에 있어서, 상기 퇴행성 질병은 신경변성 질병, 뼈 또는 관절의 퇴행성 질병, 시력 감퇴, 죽상경화증, 및 빈혈로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 사용.

#### 청구항 42

표피의 만성 또는 급성 상태의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 화합물의 사용.

#### 청구항 43

제 42 항에 있어서, 상기 급성 또는 만성 상태는 상처, 화상, 찰과상, 이식 부위, 감염성 제제로 인한 손상, 만성 정맥 궤양, 당뇨 궤양, 압박 궤양, 욕창, 점막 통증 또는 궤양, 및 켈로이드 형성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 사용.

#### 청구항 44

제 38 항 또는 제 42 항에 있어서, 상기 단리 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II인 것을 특징으로 하는 사용.

#### 청구항 45

시험관 내 또는 생체 외 세포의 복제 역량을 향상시키는 방법으로서, 상기 세포를 상기 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 효과적인 양으로 제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 46

제 45 항에 있어서, 상기 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 47

제 45 항에 있어서, 상기 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 아스트라갈로시드 IV 16-온, 시클로아스트라제놀 6-β-D-글루코피라노시드, 시클로아스트라제놀 3-β-D-실로피라노시드, 및 20R, 24S-에폭시-3β, 16β, 25-트리히드록시-9β-메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔(본원에서 5로서 칭해짐)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 48



제 45 항에 있어서, 상기 세포는 환자로부터 얻은 체외이식 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 49

제 45 항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 50

제 45 항에 있어서, 상기 세포는 HIV-제한  $CD8^+$  세포인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 51

TRAP 분석에서 측정되는 바와 같이, 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 텔로머라제 활성을 증가시키기 위한 능력을 위해, 제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 화합물의 유도체를 테스트하는 단계, 및 그것이 용매 중  $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 상기 TRAP 분석에서 측정되는 바와 같이, 상기 용매로 처리된 상기 세포에서 측정된 것 보다 적어도 50% 이상으로 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 텔로머라제 활성의 수준을 생성하기에 효과적이라면 그 유도체를 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 유효한 화합물을 선택하는 방법.

#### 청구항 52

제 51 항에 있어서, 상기 유도체는 그것이 용매 중  $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 상기 TRAP 분석에서 측정되는 바와 같이, 상기 용매로 처리된 상기 세포에서 측정된 것 보다 적어도 50% 이상으로 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 텔로머라제 활성의 수준을 생성하기에 효과적이라면 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 53

케라티노사이트 또는 섬유아세포의 스크래치 분석에서, 상처 치료 활성을 위해, 제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 화합물의 유도체를 테스트하는 단계, 및 그것이 용매 중  $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 용매 대조군의 것 보다 적어도 50% 이상으로 상처 치료 활성을 갖는다면 그 유도체를 선택하는 단계를 포함하는 표피의 급성 또는 만성 상태의 치료를 위한 제제를 선택하는 방법.

#### 청구항 54

제 53 항에 있어서, 상기 유도체는 그것이 용매 중  $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 용매 대조군의 것 보다 적어도 100% 이상으로 상처 치료 활성을 갖는다면 그 유도체를 선택하는 단계를 포함하는 표피의 급성 또는 만성 상태의 치료를 위한 제제를 선택하는 방법.

#### 청구항 55

제 1 항에서 정의된 바와 같은 화학식 I, 제 8 항에서 정의된 바와 같은 화학식 II, 또는 제 12 항에서 정의된 바와 같은 화학식 III의 단리 화합물의 기능식품상 제형을 포함하는 기능식품 조성물.

#### 청구항 56

제 55 항에 있어서, 상기 단리 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 57

제 56 항에 있어서, 상기 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 아스트라갈로시드 IV 16-온, 시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드, 시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드, 및 20R, 24S-에폭시-3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 25-트리히드록시-9 $\beta$ -메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔(본원에서 5로서 칭해짐)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

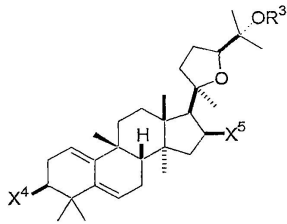
#### 청구항 58

제 55 항에 있어서, 상기 기능식품상 제형은 상기 화합물에 더하여, 기능식품 약용식물 추출물을 포함하는 것을

특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 59

화학식 II의 화합물.



II

[상기식에서,

각각의  $X^4$  및  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고,

$OR^3$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되며,

상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 추가적 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 치환될 수도 있음].

#### 청구항 60

제 59 항에 있어서, 각각의  $X^4$  및  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되고,  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토(=O)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 61

제 59 항에 있어서,  $X^4$ 는 OH 또는 1개의 글리코시드이고, 각각의  $X^5$  및  $OR^3$ 는 OH인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 62

제 61 항에 있어서,  $X^4$ 는 OH인 것을 특징으로 하는 화합물.

### 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 세포의 텔로머라제 활성을 유도하기 위한 방법 및 조성물에 관한한다.

### 배경기술

[0002] 텔로머라제는 텔로미어의 말단에 대한 텔로머(telomeric) 반복의 첨가를 촉매하는 리보핵산 단백질이다. 텔로미어는 염색체의 말단을 덮는 반복 서열의 긴 확장이며 염색체를 안정시키는 것으로 여겨진다. 사람에서, 텔로미어는 전형적으로 길이가 7-10 kb이고 서열 -TTAGGG-의 다중 반복을 포함한다. 텔로머라제는 대부분의 성인 세포에서 발현되어 있지 않으며, 텔로미어 길이는 연속적인 원형의 복제를 감소시킨다. 특정한 수의 원형 복제 이후에, 텔로미어의 점진적인 축소는 세포가 말단 붕괴 단계에 들어가도록 야기하고, 이어서 세포 노쇠로 이끈다. 특정 질병은 신속한 말단 손실로 인한 미성숙 세포 노쇠와 관련한다. 사람 세포에서 사람 텔로머라제 단백질을 코딩하는 유전자의 발현은 불멸의 표현형, 아마도 세포의 천연 노쇠 경로를 우회함으로써 주어진 것을 보였다. 또한, 짧은 텔로미어를 갖는 노화 세포에서 텔로머라제 유전자의 발현은 텔로미어 길이의 증가를 생성하고 더 젊은 세포와 전형적으로 연관된 표현형을 회복하는 것으로 나타났다.

[0003] 암 세포 및 특정 줄기 세포와는 반대로 체세포는 텔로머라제 활성을 거의 또는 전혀 갖지 않으며 적어도 일부 염색체의 종말단이 중대한 길이로 단축되는 경우 분열을 멈추어서 프로그래밍된 세포 노화(세포사)를 이끈다. 노

쇠를 유도하는 체세포 내 텔로머 반복의 손실은 낮은 텔로머라제 활성에 의해 증대되므로, 텔로미어에 대한 텔로머 반복의 어레이를 첨가하는 효과를 갖는 텔로머라제 활성의 유도는 그로써 필멸 체세포에 증가된 복제 역량을 부여하고, 노화 세포에 증식하고 손상된 조직을 회복함에 있어서 세포 주기를 적절히 빠져나가는 능력을 부여한다.

- [0004] 체세포의 증가된 텔로머라제 활성의 장래의 치료적 이득은 예를 들어, 감염된 CD4+ 세포를 죽이는 원인이 되는 세포 독성 T 림프구(CD8<sup>+</sup> 세포)의 조기 노쇠를 특징으로 하는 AIDS의 치료(예를 들어, [Dagarag et al., 2003] 참조); 알츠하이머 환자의 신경보호(예를 들어, [Mattson, 2000] 참조); 상처 치료, 및 예를 들어, 부신피질 세포(예를 들어, [Thomas et al., 2000] 참조) 또는 골수와 같은 체외이식 세포 또는 스트로마/간엽 이식 세포(예를 들어, [Simonsen et al., 2002] 참조)의 유지를 포함한다. 이들 참고문헌의 모든 인용이 하기에 나타난다.
- [0005] 텔로머라제의 이들 및 다른 특성을 논의하는 참고문헌은 하기를 포함한다:
- [0006] Allsopp, R. C. et al., "Telomere shortening is associated with cell division in vitro 및 in vivo", Exp. Cell Res. 220(1) : 194-200 (1995년 9월).
- [0007] Allsopp, R. C. et al., "Telomerase is required to slow telomere shortening 및 extend replicative lifespan of HSC during serial transplantation", Blood (e-publication) 2003년 3월 27일.
- [0008] Bodnar, A. G. et al., "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells" Science 279 (5349): 349-52 (1998년 1월 16일).
- [0009] Cech, T. R. et al., U. S. Patent No. 6,093, 809 (2000년 7월 25일).
- [0010] Cech, T. R. et al., U. S. Patent No. 6,166, 178 (2000년 12월 26일).
- [0011] Cech, T. R. et al., U. S. Patent No. 6,261,836 (2001년 7월).
- [0012] Chiu, C. P. et al., "Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase" Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 214 (2): 99-106 (1997년 2월).
- [0013] Dagarag, M. et al., "Differential impairment of lytic 및 cytokine functions in senescent human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes", J. Virol. 77 (5): 3077-83 (2003년 3월).
- [0014] Farwell, D. G. et al., "Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase", American Journal of Pathology 156 (5): 1537-47 (2000년 5월).
- [0015] Fujimoto, R. et al., "Expression of telomerase components in oral keratinocytes 및 squamous cell carcinomas", Oral Oncology 37 (2): 132-40 (2001년 2월).
- [0016] Funk, Walter D. et al., "Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro- aged fibroblasts in a reconstituted skin model", Experimental Cell Research 258 (2): 270-278 (2000년 8월 1일).
- [0017] Hannon, G. J. 및 Beach, D. H. , "Increasing proliferative capacity 및 preventing replicative senescence by increasing telomerase activity 및 inhibiting pathways inhibiting cell proliferation", PCT Int. Appl. Pubn. No. WO 2000/031238 (2000년 6월).
- [0018] Hannon, G. J. et al., "Extension of cellular lifespan using telomerase-activating therapeutic agents", PCT 국제 출원 공개 번호 제 WO 99/35243호 (1999년 7월).
- [0019] Harle-Bachor, C. et al., "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): 6476-81 (1996년 6월 25일).
- [0020] Harley, C. B. et al., "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts", Nature 345 (6274) : 458-60 (1990년 3월 31일).
- [0021] Harley, C. B. et al., "Telomerase, cell immortality, and cancer", Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 59: 307-15 (1994).

- [0022] Harley, C. B. et al., "Telomeres and telomerase in aging and cancer", Curr. Opin Genet. Dev. 5 (2): 249-55 (1995년 4월).
- [0023] Harley, C. B. et al., "Telomerase 및 cancer", InzportarztAdv. Oncol. 57-67 (1996).
- [0024] Harley, C.B., "Human aging and telomeres", Ciba Found. Symp. 211:129-39 (1997).
- [0025] Harley, C. B. , "Telomerase is not an oncogene", Oncogene 21: 494-502 (2002)
- [0026] Henderson, S. et al., "In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell transformation", J.Cell Biol. 134(1) : 1-12 (1996년 7월).
- [0027] Jiang, X. R. et al., PCT 공개 번호 제 WO 02/91999호.
- [0028] Jiang, X. R. et al., "Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype", Nature Genetics 21(1) : 111-4 (1999년 1월).
- [0029] Kang, M. K. et al., "Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres", Cell Growth & differentiation 9(1) : 85-95 (1998년 1월).
- [0030] Kim, N. W. et al., "Telomerase activity assays", U. S. Patent No. 5,629, 154 (1997년 5월).
- [0031] Lee, K. M. et al., "Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas", Biochem Biophys Res Commun 301 (4):1038-44 (2003년 2월 21일).
- [0032] Ludwig, A. et al., "Ribozyme cleavage of telomerasemRNA sensitizes breast epithelial cells to inhibitorsoftopoisomerase", CancerRes., 61-3053-3061 (2001).
- [0033] Mattson, M. P. , "Emerging neuroprotective strategies for Alzheimer's disease: dietary restriction, telomerase activation, and stem cell therapy", Exp Gerontol. 35 (4): 489-502 (2000년 7월).
- [0034] Morales, C. P. et al., "Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase", Nature Genetics 21(1) :115-8 (1999년 1월).
- [0035] Oh, H. and Schneider, M. D. , "The emerging role of telomerase in cardiac muscle cell growth and survival", J Mol Cell Cardiol 34 (7):717-24 (2002년 7월).
- [0036] Simonsen, J. L. et al., "Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells", Natbiotechnol 20 (6): 592-6 (2002년 1월).
- [0037] Thomas, M. , Yang, L. , and Hornsby, P. J., "Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase", Natbiotechnol 18 (1) : 39-42 (2000년 1월).
- [0038] Vasa, M. et al., "Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence", Circ. Res. 87 (7): 540-542 (2000).
- [0039] Villeponteau, B. et al., 미국 특허 제 5, 583, 016호 (1996년 12월).
- [0040] West, M. D. et al., "Methods of screening for Compounds that derepress or increase telomerase activity", 미국 특허 제 6,007,989호(1999년 12월).
- [0041] White, M. A. , "Assembly of telomerase components 및 chaperonins 및 methods and compositions for inhibiting or stimulating telomerase assembly", PCT 국제 출원 공개 번호 제 WO 2000/08135호 (2000년 2월).
- [0042] Yang, J. et al., "Telomerized human microvasculature is functional in vivo", Nature Biotechnology (미국) 19 (3): 219-24 (2001년 3월).
- [0043] Yang, J., et al., "Human endothelial cell life extension by telomerase expression", J. Biol.Chem. 274 (37): 26141-8 (1999년 9월 10일).

- [0044] Yudoh, K. et al., "Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shortening 및 replicative senescence in human osteoblasts", *J. Bone and Mineral Res.* 16 (8) : 1453-1464 (2001).
- [0045] 증가하는 텔로머라제 활성의 치료적 방법이 상기 모두 인용되는 문헌 [Bodnar (1997), White (2000), Hannon et al. (1999; 2000), Franzese et al. (2001), 및 Yudoh et al. (2001)]에 의해 조사되었다. 이들 보고에서, 텔로머라제 활성은 일반적으로 사람 텔로머라제의 단백질 성분을 코딩하는 유전자인 hTERT의 과발현에 의해, 또는 예를 들어, 열 shock 단백질(White)과 같은 텔로머라제의 어셈블리를 조정하는 단백질의 발현에 의해 증가된다. 문헌 [Franzese et al.]는 말초 혈액 단핵 세포 내 증가된 텔로머라제 활성인 HIV 감염의 치료를 위해 처방된 프로테아제 억제제인 사퀴나비르(Saquinavir)를 보고하였으며; 문헌 [Vasa et al.]은 산화 질소(NO) 전구체의 투여에 의하여, 텔로머라제의 활성, 및 결과적인 내피 노쇠의 지연을 설명하였다.
- [0046] 아스트라갈로시드(아스트라갈로시드) 및 진세노시드(진세노시드)
- [0047] 아스트라갈로시드 및 진세노시드 과(families)의 화합물이 각종 생물학적 효능을 갖는 것으로서 보고되었다. 아스트라갈로시드 및 진세노시드의 생물학적 활성을 논하는 참고문헌은 하기를 포함한다:
- [0048] Bedir, E. et al., "Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene Glycosides from *Astragalus* species", *Biol & Pharm Bull* 23 (7): 834-7 (2000).
- [0049] Binder, B. et al., "Use of triterpensaponins, such as notoginsenoside RI(NR1) and/or Astragaloside(ASIV) for preparing medicaments", 미국 특허 제 5,770,578호 (1998년 6월).
- [0050] Calzada, L. et al., "Effect of tetracyclic triterpenes (argentatins A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumors of human breast", *Medical Science Research* 23 (12): 815-16 (1995).
- [0051] Chen, X. et al., "Protective effect of Ginsenoside Rg1 on dopamine-induced apoptosis in PC12 cells", *Acta Pharmacol Sinica* 22 (8): 673-678 (2001).
- [0052] Hashimoto, K. et al., "Skin tissue regeneration promoters comprising Ginsenoside Rb1", WO 200192289 (2001); EP1295893 A1 (2003).
- [0053] Hong, H.-Y. et al., "Stimulatory effects of Ginsenoside-Rg1 on p56lck kinase 및 cell proliferation in Jurkat T cells", *Korean J. Ginseng Sci.* 19 (2): 117-21 (1995).
- [0054] Huang, Y. et al., "Selected non-timber forest products with medicinal applications from Jilin Province in China", Conference Title: Forest communities in the third millennium: Linking research, business, and policy toward a sustainable non-timber forest product sector; Kenora, Ontario, Canada, 1-4 October, 1999; General Technical Report-North Central Research Station, USDA Forest Service (No. NC-217): p. 93-101 (2000).
- [0055] Kaneko, M. et al., "Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leukopenia in mice administered a Japanese ethical herbal drug, Hochu-ekki-to", *Immunopharmacology* 44 (3): 223-231 (1999).
- [0056] Kinjo, J. et al., "Anti-herpes virus activity of fabaceous triterpenoidal saponins", *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23 (7): 887-9 (2000년 7월).
- [0057] Khushbaktova, Z.A. et al., "Influence of cycloartanes from plants of the genus *Astragalus* and their synthetic analogs on the contractile function of the myocardium and the activity of Na, K-ATPase", *Chem. Nat. Compounds* 30 (4) : 469-473 (1994).
- [0058] Lee, Y. J. et al., "Ginsenoside-Rg1, one of the major active molecules from *Panax ginseng*, is a functional ligand of glucocorticoid receptor", *Mol Cell Endocrinol* 133 (2): 135-40 (1997년 10월).
- [0059] Liu, P. et al., "Effect of Ginsenosides Rb1, Rg1, Rh1 및 Re on proliferation of cells in vitro", *Tianranzhan Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 8 (4): 36-41 (1996); CA Abstract No. '1997 : 400846.
- [0060] Oda, K. et al., "Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal 및 food plants", *Biol. Chem.* 381(1) : 67-74 (2000).

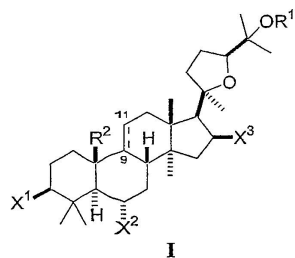
- [0061] Pistelli, L., et al., "Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts 및 isolated saponins from *Astragalus verrucosus*", *Fitoterapia* 73 (4):336-339 (2002).
- [0062] Prince, R. L. and Min, X., "Compositions and method for treating or preventing osteoporosis", PCT 공개 번호 제 WO 2001/01996.
- [0063] Sengupta, S. et al., "Pharmaceutically effective 화합물s 및 their use", PCT 공개 번호 제 WO 2002/69980 및 WO 2002/07732호.
- [0064] Wang, S. et al., "Promoting effect of Ginsenoside Re on the proliferation of murine bone marrow cells", *Baichuan Yike Daxue Xuebao* 23 (2): 141-142(1997) ; CA 요약 제 1997: 570234호.
- [0065] Wang, Y-P. et al., "Effect of Astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice", *Acta Pharmacologica Sinica* 23 (3): 263-6 (2002년 3월).
- [0066] Yasukawa, K. et al., "Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis", *Oncology* 48(1) : 72-6 (1991).
- [0067] Yamamoto, M. et al., "The stimulatory effects of ginseng saponins on proliferation and DNA synthesis of human vascular endothelial cells 및 skin fibroblasts in relation to cytokines or growth factors", *Nissei Byoin Igaku Zasshi* 24(1) : 12-13 (1996).
- [0068] Zhang W. J. et al., "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): 273-80 (1997년 7-8 월).
- [0069] Zi-Pu, L. and Qian, C., "Effects of Astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats", *Acta Pharmacol Sin* 23 (10): 898-904 (2002년 10월).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0070] 본원에서 설명되는 방법은 일반적으로 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기 위한 방법 및 이러한 방법에 있어서 사용을 위한 조성물에 관한 것이다. 이러한 방법 및 조성물은 세포 배양, 즉, 시험관 내 또는 생체 외, 또는 생체 내에서, 예를 들어, 사람 피험체 및 사람이 아닌 동물, 특히 사람이 아닌 포유동물을 포함하는 피험체의 조직 내 세포 성장에 있어서 세포 상에서 사용될 수도 있다.
- [0071] 특정 구체예에서, 조성물은 하기 설명되는 바와 같이 화학식 I, II, 또는 III의 화합물을 포함한다. 본 발명의 양태는 화장품, 건강 기능 식품 및 약학적 적용에 있어서 사용을 위한 이러한 화합물의 조성물을 포함하는데, 특정 적용에 있어서 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키는 것이 이롭거나, 또는 이로울 것으로 기대됨을 보인다. 이러한 적용을 위한 그것의 화합물 및 조성물을 이용하는 방법은 또한 세포 또는 조직 내 증가하는 텔로머라제 활성에 대한 필요, 또는 이점이 결정된 후에 이러한 조성물을 적용 또는 투여하기 위한 방법을 포함하여 제공된다.
- [0072] 본 발명은 한 양태에서, 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키는 방법을 포함한다. 방법은 세포 또는 조직을 하기 화학식 I, 화학식 II, 또는 화학식 III의 단리 화합물의 조성물과 접촉시키는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 화합물은 하기 화학식 I 또는 II이다. 방법은 텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 세포 또는 조직을 동정하는 사전 준비 단계를 더 포함한다.

[0073] 화학식 I의 화합물에서:



[0074]

[0075] 각각의  $X^1$ ,  $X^2$ , 및  $X^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되고;

[0076]  $OR^1$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되며;

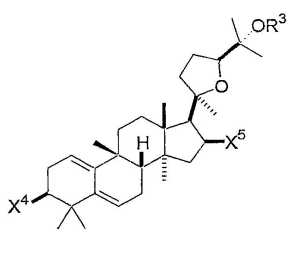
[0077] 여기서 상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함하고; 및

[0078]  $R^2$ 는 메틸이고  $\equiv$ 는 탄소 9 및 11 사이의 이중 결합을 나타내며; 또는 바람직한 구체예에서,  $R^2$ 는 탄소 9와 함께 융합된 시클로프로필 고리를 형성하고,  $\equiv$ 는 탄소 9 및 11 사이의 단일 결합을 나타낸다.

[0079] 바람직하게는, 화합물은 0, 1, 또는 2개, 더 바람직하게는 0 또는 2개의 글리코시드를 포함하며, 어느것도 추가적인 글리코시드로 치환되지 않는다. 바람직하게, 글리코시드는 D(천연 발생) 배열이다.

[0080] 화학식 I의 선택된 구체예에서, 각각의  $X^1$  및  $X^2$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고,  $X^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 선택된다. 추가적 구체예에서,  $X^1$ 은 OH 또는 1개의 글리코시드이며, 각각의  $X^2$  및  $OR^1$ 은 독립적으로 OH 또는 1개의 글리코시드이며,  $X^3$ 는 OH 또는 케토이다. 화학식 I의 전형적인 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 아스트라갈로시드 IV 16-온, 시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드, 및 시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드를 포함한다. 선택된 구체예에서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 및 아스트라갈로시드 IV 16온으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV이다.

[0081] 화학식 II의 화합물에서:



[0082]

[0083] 각각의  $X^4$  및  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고,

[0084]  $OR^3$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되며, 여기서 상기 글리코시드 상의 히드록실 기는 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 추가적으로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함한다.

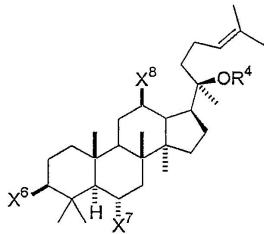
[0085] 바람직하게, 화합물은 0, 1, 또는 2개의 글리코시드를 포함하는데, 이들 중 어느 것도 추가적인 글리코시드로 치환되지 않으며; 글리코시드는 바람직하게는 D 배열이다.

[0086] 화학식 II의 선택된 구체예에서, 각각의  $X^4$  및  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시



드로부터 선택되고,  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토(=O)로부터 선택된다. 추가적 구체예에서,  $X^4$ 는 OH 또는 1개의 글리코시드이며, 각각의  $X^5$  및  $OR^3$ 는 OH이다. 한 구체예에서,  $X^4$ 는 OH이다.

[0087] 화학식 III의 화합물에서:



[0088] III

[0089] 각각의  $X^6$ ,  $X^7$ , 및  $X^8$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고,

[0090]  $OR^4$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되고,

[0091] 여기서 상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 추가적으로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함한다.

[0092] 바람직하게, 화합물은 0, 1, 또는 2개의 글리코시드를 포함하는데, 이것 중 어느 것도 추가적인 글리코시드로 치환되지 않으며; 글리코시드는 바람직하게는 D 배열이다.

[0093] 화학식 III의 선택된 구체예에서, 각각의  $X^6$ ,  $X^7$ ,  $X^8$  및  $OR^4$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되며, 바람직하게는 히드록시 및 1개의 글리코시드로부터 선택된다. 추가적 구체예에서, 각각의  $X^8$  및  $OR^4$ 는 OH이고, 각각의  $X^6$  및  $X^7$ 은 히드록실 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택된다. 여전히 추가적인 구체예에서, 각각의  $OR^4$ ,  $X^6$  및  $X^8$ 은 OH이고,  $X^7$ 는 1개의 글리코시드이다. 화학식 III의 전형적인 화합물은 진세노시드 RH1이다.

[0094] 1  $\mu\text{g/ml}$  이하 농도로 용매에서 제조되는 경우, 상기 화학식 I, II, 또는 III의 바람직한 화합물은 본원에서 설명되듯이 TRAP 분석법에서 측정되는 바와 같이 상기 용매로 처리된 상기 세포 내 적어도 50% 이상의 수준에서, TRAP 분석법에서 측정되는 바와 같이 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 텔로머라제 활성의 수준을 생성하기에 효과적이다. 추가적 바람직한 구체예에서, 화합물은 본원에서 설명되듯이 TRAP 분석법에서 측정되는 바와 같이 상기 용매로 처리된 상기 세포 내 적어도 100% 이상의 수준에서, TRAP 분석법에서 측정되는 바와 같이 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 텔로머라제 활성의 수준을 생성하기에 효과적이다.

[0095] 화학식 I-III의 전형적인 화합물은 도 1에서 묘사되는 바를 포함하며 본원에서 1 (아스트라갈로시드 IV), 2 (시클로아스트라제놀), 3 (아스트라제놀), 4 (아스트라갈로시드 IV 16-온), 5 (20R, 24S-에폭시-3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 25-트리히드록시-9 $\beta$ -메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔), 6 (시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드), 7 (시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드), 및 8 (진세노시드 RH1)로서 칭하여 진다. 선택된 구체예에서, 화합물은 1 (아스트라갈로시드 IV), 2 (시클로아스트라제놀), 3 (아스트라제놀), 4 (아스트라갈로시드 IV 16-온), 5 (20R, 24S-에폭시-3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 25-트리히드록시-9 $\beta$ -메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔), 6 (시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드), 및 7 (시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드)로서 본원에서 칭하여진 것으로부터 선택된다. 추가적 구체예에서, 화합물은 1, 2, 3, 4, 및 5와 같이 본원에서 칭하여진 것으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV(1) 또는 시클로아스트라제놀(2)이다.

[0096] 화학식 I, II, 또는 III의 단리된 화합물의 조성물을 세포 또는 조직과 접촉시키는 방법은 상기 접촉 전에, 텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 세포 또는 조직을 동정하는 단계를 포함할 수도 있다. 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시킴으로써 실현되는 이득은 예를 들어, 상기 세포 또는 상기 조직 내 세포들의 복제 역량 및/또는 수명의 증대를 포함한다.

[0097] 방법은 시험체의 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 이러한 시험체 내 상태를 진단하는 단계, 및 상기 시험체에 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 시험체는 바람직하게는 예를 들어, 사람 시험체 또



는 환자와 같은 포유동물 피험체이다. 이러한 상태는 예를 들어, HIV 감염, 예를 들어, 신경변성 질병과 같은 각종 퇴행성 질병, 뼈 또는 관절의 퇴행성 질병, 시력 감퇴, 죽상경화증, 및 빈혈을 포함할 수도 있다. 이러한 상태는 또한 표피의 상처 또는 기타 급성 또는 만성 상태를 포함하는데, 예를 들어, 화상, 찰과상, 절개, 이식 부위, 감염성 체제에 유발된 환부, 만성 정맥 궤양, 당뇨 궤양, 압박 궤양, 욕창, 점막 궤양, 및 켈로이드 형성을 포함한다.

[0098] 따라서, 본 발명은 환자의 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시킴으로써, 상기 주지되는 바와 같이 환자의 상태를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 상기 정의된 바와 같이 화학식 I, 화학식 II, 또는 화학식 III의 단리 화합물의 조성물을 이러한 치료가 필요한 환자에 투여하는 것을 포함한다. 조성물은 예를 들어, 경구, 국소, 또는 비경구적으로 각종 루트에 의해 투여될 수도 있다.

[0099] 본 발명은 피험체의 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시킴에 의한 치료를 받아야 하는 피험체 내 질병 상태를 진단하는 방법, 및 이러한 치료를 필요로 하는 피험체에 약학적 비히클로 상기 설명되는 바와 같이 화학식 I, II 또는 III의 화합물, 바람직하게는 화학식 I 또는 II의 화합물을 투여하는 방법을 더 제공한다.

[0100] 추가적 양태에서, 본 발명은 표피 세포를 상기 정의된 바와 같은 화학식 I, 화학식 II, 또는 화학식 III의 단리된 화합물의 국소 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 표피의 급성 또는 만성 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II이다. 추가적 구체예에서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 아스트라갈로시드 IV 16-온, 시클로아스트라제놀 6-β-D-글루코피라노시드, 시클로아스트라제놀 3-β-D-실로피라노시드, 및 20R, 24S-에폭시-3β, 16β, 25-트리히드록시-9β-메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔 (본원에서 5이라 칭하여짐)으로부터 선택된다.

[0101] 조성물이 접촉된 세포는 또한 생체 외에서 예를 들어, 세포-기재 치료, 또는 배양의 다른 세포와 접촉되는 체외 이식 세포를 포함할 수도 있다. 따라서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 화합물의 선택된 구체예를 포함하여 상기 정의된 바와 같은 화학식 I, 화학식 II, 또는 화학식 III의 화합물을 포함하는 유효량의 조성물을 상기 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 시험관 내 또는 생체 외에서 세포의 복제 역량을 증강시키는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 화합물은 상기 정의된 바와 같은 화합물의 선택된 구체예를 포함하는 화학식 I 또는 화학식 II이다. 일반적으로, 세포는 비-형질전환 된 포유동물 세포이며; 선택된 구체예에서, 세포는 줄기 세포로서, 예를 들어, 골수 줄기 세포, 골수 스트로마 세포, 젊은 또는 초기 경과 표피 섬유아세포, 섬 전구체 세포, 신경반구(neurosphere) 세포, 부신피질 세포, 근육 위성 세포, 골아세포, 망막 색소 상피 세포, 및 HIV-제한 CD8<sup>+</sup> 세포와 같다.

[0102] 관련 양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 비히클 내에 상기 묘사되는 바와 같은 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공하는데:

[0103] 각각의  $X^1$  및  $X^2$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고;

[0104]  $X^3$ 는 케토이며;

[0105] OR<sup>1</sup>은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되고;

[0106] 여기서 상기 글리코시드 상 어떤 히드록실 기는 추가적인 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함하며;

[0107] R<sup>2</sup>는 메틸이고 ≡는 탄소 9 내지 11사이의 이중 결합을 나타내거나; 또는, 바람직한 구체예에서, R<sup>2</sup>는 탄소 9와 함께 융합 시클로프로필 고리를 형성하며, ≡는 탄소 9 및 11 사이에 단일 결합을 나타낸다.

[0108] 바람직하게는, 화합물은 0, 1, 또는 2개의 글리코시드를 포함하며, 이들 중 어느 것도 추가적인 글리코시드로 치환되지 않으며, 글리코시드는 D 배열이다.

[0109] 조성물의 선택된 구체예에서,  $X^1$ 은 OH 또는 글리코시드이며, 각각의  $X^2$  및 OR<sup>1</sup>은 독립적으로 OH 또는 글리코시드이다. 한 구체예에서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV 16-온(본원에서 4이라 칭하여짐)이다.

[0110] 택일적으로, 화합물은 약학적으로 허용가능한 비히클 내에, 상기 묘사되는 바와 같은 화학식 I의 화합물을 포함

하는데,

- [0111]  $X^1$  및  $X^2$  중 하나는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토로부터 선택되고 나머지는 1개의 글리코시드 이고;
- [0112] 각각의  $X^3$  및  $OR^1$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고;
- [0113] 상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 추가적인 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 치환될 수도 있으며, 이러한 화합물은 최대 3개의 글리코시드를 포함하며;
- [0114]  $R^2$ 는 메틸이고  $\equiv$ 는 탄소 9 및 11 사이의 이중 결합을 나타내거나; 또는, 바람직한 구체예에서,  $R^2$ 는 탄소 9와 함께 융합 시클로프로필 고리를 형성하며,  $\equiv$ 는 탄소 9 및 11 사이의 단일 결합을 나타낸다.
- [0115] 바람직하게, 화합물은 1개의 글리코시드를 포함하는데, 이것은 추가적인 글리코시드로 치환되지 않으며, D 배열이다. 한 구체예에서, 화합물은 시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드 (본원에서 6이라 칭하여짐) 및 시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드 (본원에서 7이라 칭하여짐).
- [0116] 택일적으로, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 비히클 내에 상기 정의되는 바와 같은 화학식 II의 화합물을 포함한다. 화합물의 선택된 구체예가 또한 상기 정의된다. 한 구체예에서, 화합물은 본원에서 5로서 칭하여지는 것이다.
- [0117] 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 선택된 구체예를 포함하여 상기 정의된 바와 같은 화학식 II의 화합물을 제공한다. 한 구체예에서, 화합물은 본원에서 5로서 칭하여지는 것이다.
- [0118] 관련 양태에서, 본 발명은 상기 정의되는 바와 같이 화학식 I, 화학식 II, 또는 화학식 III의 단리 화합물의 국소적 약학적 조성물을 제공한다. 화합물의 선택된 구체예가 또한 상기 정의된다. 바람직한 구체예에서, 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II이다. 추가적 구체예에서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 아스트라갈로시드 IV 16-온, 시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드, 시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드, 및 20R, 24S-에폭시-3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 25-트리히드록시-9 $\beta$ -메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔(본원에서 5로서 칭하여짐). 국소 조성물은 전형적으로 유화제(emulsifier), 농후화제(thickener), 및 피부 완화제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 포함한다. 이러한 조성물은 상처 또는 표피의 다른 급성 또는 만성 상태의 치료를 위해 사용될 수도 있다.
- [0119] 다른 관련 양태에서, 본 발명은 상기 정의되는 바와 같이 화학식 I, 화학식 II, 화학식 III의 단리 화합물의 기능식품 제형을 포함하는 기능식품 조성물을 제공한다. 화합물의 선택된 구체예가 또한 상기 정의된다. 바람직한 구체예에서, 화합물은 상기 정의되는 바와 같은 선택된 구체예를 포함하는 화학식 I 또는 화학식 II이다. 추가적 구체예에서, 화합물은 아스트라갈로시드 IV, 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 아스트라갈로시드 IV 16-온, 시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드, 시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드, 및 20R, 24S-에폭시-3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 25-트리히드록시-9 $\beta$ -메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔(본원에서 5로서 칭하여짐)으로부터 선택된다. 추가적 구체예에서, 기능식품 제형은 화학식 I, II 또는 III의 단리 화합물에 더하여, 아스트라갈러스 멤브레나시우스(*Astragalus membranaceus*)의 추출물일 수 있는 기능식품성 약초 추출물을 포함한다.
- [0120] 상기 설명되는 바와 같이 선택된 구체예를 포함하여, 상기 정의되는 대로 화학식 I, II, 또는 III의 단리 화합물은 또한 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 의해 치료받는 질병을 치료하기 위한 약제의 제조를 위해 사용될 수 있다. 이러한 질병의 예는 하기 보다 더 상세히 논의된다. 유사하게, 상기 설명되는 바와 같은 선택된 구체예를 포함하여, 상기 정의된 바와 같은 화학식 I, II, 또는 III의 단리 화합물은 또한 표피의 만성 또는 급성 상태의 치료를 위한 약제의 제조를 위해 사용될 수 있다. 이러한 사용의 바람직한 구체예에서, 단리 화합물은 상기 설명되는 바와 같이 화학식 I 또는 화학식 II의 선택된 구체예를 포함하여 화학식 I 또는 화학식 II이다.
- [0121] 또한 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 효과적인 화합물을 선택하는 방법이 제공된다. 이 방법에 따라서, 상기 정의되는 바와 같이 화학식 I, 화학식 II, 화학식 III의 화합물의 유도체가 본원에서 설명되듯이 TRAP 분석법에 의해 측정되는 바와 같이 케라티노사이트 또는 섬유아세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키는 그것의 능력에 대하여 테스트된다. 유도체는 1  $\mu$ g/ml 이하의 농도의 용매에서 제형되는 때 상기 용매로 처리된 상기 세포에서 측정된 적어도 50% 이상, 및 바람직하게는 적어도 100% 이상에서 TRAP 분석법에서 측정된 바와 같이 케라티노사이트 또는 섬유아세포 내 텔로머라제 활성의 수준을 생성시키기에 효과적이라면 선택된다. 후속하

여 유도체는 국소적, 약학적 또는 기능식품상의 비히클로 제형될 수 있다.

[0122] 또한 관련 양태에서, 표피의 급성 또는 만성 상태의 치료를 위한 제제를 선택하는 방법이 제공된다. 이 방법에 따라서, 상기 정의되는 바와 같은 화학식 I, 화학식 II, 화학식 III의 화합물의 유도체는 본원에서 설명되는 바와 같이 스크래치 분석법에서 케라티노사이트 또는 섬유아세포 내 상처 치료 활성에 대하여 테스트된다. 유도체는 그것이 스크래치 분석법에서 측정되는 바와 같이 상처 치료 활성을 갖는다면, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서, 적어도 50% 이상의 용매 대조군, 바람직하게는 적어도 100% 이상의 용매 대조군에서 선택된다. 후속하여 유도체는 국소 비히클과 함께 제형될 수 있다.

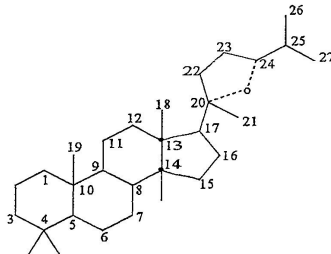
[0123] 이들 및 본 발명의 기타 목적 및 특징은 본 발명의 하기 상세한 설명이 수반되는 도면과 함께 읽으면 더욱 완전히 명백해질 것이다.

## 과제의 해결 수단

[0124] I. 정의

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이 하기 용어는 달리 지적되지 않는다면 하기 주어진 의미를 갖는다.

[0126] 본원에서 설명되는 화합물의 명명법을 위해 사용되는 일반적인 탄소 원자 넘버링 도해가 하기에 보여진다. (이 도해에서 보여주는 구조식 II의 화합물은 19 탄소를 결핍하고, 구조식 III의 화합물은 18 탄소를 결핍함을 주지 하시오. 따라서, 넘버링 도해는 본 발명의 조성물을 제한하도록 의도되지 않는다.)



[0127] "알킬"은 분지형 또는 선형일 수도 있는 탄소 및 수소를 함유하는 완전히 포화된 비환식 1가 라디칼을 나타낸다. 알킬 기의 예는 메틸, 에틸, n-부틸, t-부틸, 및 이소프로필이다. "알콕시"는 형태 OR의 기를 나타내고, R은 상기 정의되는 바와 같이 알킬이다. "아실옥시"는 형태  $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$ 의 기를 나타내고, R은 상기 정의되는 바와 같은 알킬이다. 따라서, "아실"은 기  $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 을 나타낸다.

[0129] "저급 알킬"(또는 저급 알콕시, 또는 저급 아실옥시)는 1 내지 6 탄소 원자를 갖는 이러한 기를 나타내고; 선택된 구체예에서, 이러한 기들은 1 내지 4 탄소 원자, 1 또는 2 탄소 원자 또는 1 탄소 원자(즉, 메틸, 메톡시, 아세틸옥시)를 포함한다.

[0130] "줄기 세포"는 분화하고 생후 시기 동안의 사이클에서 더 분화하고 특수화될 수 있는 세포를 제공하는 능력을 보유하는 일반적 계통의 상대적으로 미분화된 세포를 나타낸다(예를 들어, 피부의 기저층 또는 조혈 조직 내 줄기 세포로서, 예를 들어, 모든 각종 유형의 혈액 세포가 유도되는 골수의 원시 세포와 같은 것).

[0131] 화합물과 관련하여, 용어 "세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 효과적인"은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서 화합물을 함유하는 조성물은 본원에서 설명되는 바와 같이 TRAP 분석법에서 측정되듯이, 케라티노사이트 또는 섬유아세포 내 텔로머라제 활성의 수준을 생성하기에 효과적임을 의미하는데, 이는 적어도 1.5(즉, 적어도 50% 이상)의 인자에 의해, TRAP 분석에서 측정되는 바와 같이, 화합물을 함유하지 않는 유사한 제형에 의해 생성되는 수준 이상이다. 바람직한 구체예에서, 화합물은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서, 본원에서 설명되는 바와 같은 TRAP 분석에서 측정되듯이, 이러한 세포 내 텔로머라제 활성의 수준을 생성하기에 효과적이며, 이는 본 화합물을 함유하지 않는 유사한 제형에 의해 생성되는 수준 보다 적어도 2(즉, 적어도 100% 더 큼)의 인자 만큼 크다.

[0132] 환자에 대한 화합물의 투여와 관련하여, "유효량"은 이러한 바람직한 결과가 달성되는 환자의 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 효과적인 양을 나타낸다. 시험관 내 또는 생체 외 세포의 처리와 관련하여, "유효량"은 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시켜서, 이로써 세포의 복제 역량 및/또는 수명을 증가시키기에 효과적인 양을 나타낸다.

[0133] 본원에서  $\%(\text{w}/\text{v})$ 로서 표현되는 농도에 있어서, 100 $\%(\text{w}/\text{v})$ 는 1 g 용질/ml 용매에 대응한다. 예를 들어,

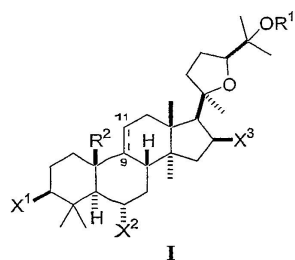
0.1%(w/v) = 1 mg/ml.

[0134] "단리 화합물의 제형"은 제형을 생성하기 위한 하나 이상의 기타 성분(활성 또는 비활성 성분일 수 있음)을 단리 화합물과 조합함으로써 제조되는 제형을 의미한다. 화합물은 화합물이 천연 공급원으로부터 직접 정제되는 곳에서, 구문 "단리 화합물"은 화합물(제형 전)이 천연 공급원 내 화합물의 순도와 비교하여 적어도 100배 이하로 정제되었음을 요구한다. 화합물이 천연 공급원으로부터 직접 정제되지 않는 곳에서, 구문 "단리 화합물"은 하나 이상의 화학 합성 과정을 포함하는 공정에 의해 생성되어, 적어도 5%(w/w) 순도의 화합물의 제조를 야기하는 (제형 전) 화합물을 의미한다.

[0135] II. 텔로머라제 활성을 증가시키기 위한 방법 및 조성물

[0136] 본 발명에 따라서, 조성물 및 방법이 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기 위해 제공된다. 상기 방법에 따라서, 세포 또는 조직은 화합물이 부재하는 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성의 수준과 비교하여, 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 유효한 양으로, 본원에서 개시된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 단리 화합물의 제형과 접촉한다. 방법은 또한 텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 세포 또는 조직을 동정하는 사전 준비 단계를 포함할 수도 있다.

[0137] 한 구체예에서, 화합물은 화학식 I으로 표현된다:



[0138]

[0139] 화학식 I에서, 각각의  $X^1$ ,  $X^2$ , 및  $X^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고, 기  $OR^1$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택된다. 선택된 구체예에서, 각각의  $X^1$  및  $X^2$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택된다.

[0140] 화학식 I의 선택된 구체예에서,  $R^2$ 는 메틸이고  $\equiv$ 는 묘사되는 바와 같이, 탄소 9 내지 11 사이의 이중 결합으로 나타낸다. 다른 구체예에서,  $R^2$ 는 탄소 9와 함께 융합 시클로프로필 고리를 형성하며;  $\equiv$ 는 예를 들어 화합물 1(도 1 참조)에 나타내는 바와 같이, 탄소 9 내지 11 사이의 단일 결합을 나타낸다.

[0141] 화학식 I, II, 또는 III(또는 그것의 유도체)의 어떤 대상 화합물에 관하여 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "글리코시드"는 공지된 글리코시드(즉, 리보시드(riboside), 아라비노시드(arabinoside), 실로시드(xyloside), 리소시드(lyxoside), 알트로시드(altrioside), 글루코시드(glucoside), 만노시드(mannoside), 구로시드(guloside), 이오시드(idoside), 갈락토시드(galactoside), 및 탈로시드(taloside)) 중 하나를 의미한다. 글리코시드는 전형적으로 6-원 고리(피라노스) 형태, 예를 들어, 글루코피라노시드 또는 만노피라노시드이다. 선택된 구체예에서, 글리코시드는 D-글리코시드이며; 즉, 그것은 천연 발생 단당류에서 발견되는 배열을 가진다. 특이적 예는 D-리보피라노시드, D-아라비노피라노시드, D-실로피라노시드, D-글루코피라노시드, 만노피라노시드, 및 D-갈락토피라노시드를 포함한다. 추가적 구체예에서, 결합은  $\beta$  배열은 예를 들어,  $\beta$ -D-글루코피라노시드이다.

[0142] 화학식 I, II, 또는 III(또는 그들의 유도체)의 대상 화합물 내에 존재하는 1개의 글리코시드 상 어떤 유리 히드록실 기는 추가적 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실, 예를 들어 메톡시 또는 아세틸옥시로 더 치환될 수도 있다. 바람직하게는, 최대 1개의 이러한 히드록실 기는 추가적 글리코시드로 치환된다. 더 바람직하게는, 어떤 이러한 히드록실 기도 추가적 글리코시드로 치환되지 않는데, 즉 치환은 아세틸과 같은 저급 아실, 또는 메틸과 같은 저급 알킬이다. 한 구체예에서, 글리코시드(들) 상 모든 히드록실 기는 치환되지 않는다.

[0143] 바람직하게는, 화학식 I, II, 또는 III(또는 그것의 유도체)의 대상 화합물은 최대 3개의 글리코시드, 더 바람직하게는 최대 2개의 글리코시드를 포함한다. 선택된 구체예에서, 화합물은 0, 1, 또는 2개의 글리코시드를 포

함하며, 이들 중 어느 것도 추가적 글리코시드로 치환되지 않는다. 추가적인 선택된 구체예에서, 특히 화학식 I 과 관련하여, 화합물은 0 또는 2 개의 글리코시드를 포함하며, 이들 중 어느 것도 추가적 글리코시드로 치환되지 않는다.

[0144] 화학식 I의 선택된 구체예에서, 각각의  $X^1$  및  $X^2$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 글루코피라노시드, 및 실로피라노시드로부터 독립적으로 선택되고,  $X^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 글루코피라노시드, 및 실로피라노시드로부터, 바람직하게는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토로부터 선택된다.

[0145] 화학식 I의 추가적 구체예에서,  $X^1$ 은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및  $\beta$ -D-실로피라노시드로부터 선택되고;  $X^2$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및  $\beta$ -D-글루코피라노시드로부터 선택되며;  $X^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토(=O)로부터 선택되고; OR<sup>1</sup>은 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및  $\beta$ -D-글루코피라노시드로부터 선택된다.

[0146] 화학식 I의 추가적인 선택된 구체예에서,  $X^1$ 은 OH 또는 1개의 글리코시드이며, 각각의  $X^2$  및 OR<sup>1</sup>은 독립적으로 OH 또는 글리코시드이며,  $X^3$ 는 OH 또는 케토이다. 추가적 구체예에서, 각각의  $X^1$  및  $X^2$ 는 OH 또는 글리코시드이고, OR<sup>1</sup>은 OH이며,  $X^3$ 는 OH이다. 여전히 추가적인 구체예에서,  $X^1$ 은  $\beta$ -D-실로피라노시드이고,  $X^2$ 는  $\beta$ -D-글루코피라노시드이며, OR<sup>1</sup>은 OH이고,  $X^3$ 는 OH이다. 다른 구체예에서, 각각의  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  및 OR<sup>1</sup>은 OH이다.

[0147] 각각의 이들 설명된 구체예에 대하여, 추가적 구체예는 R<sup>2</sup>가 메틸이고 ≡가 이중 결합을 나타내는 화합물을 포함하며, 다른 구체예는 일반적으로 바람직하게는 R<sup>2</sup>가 탄소 9와 함께 융합 시클로프로필 고리를 형성하는 화합물을 포함한다.

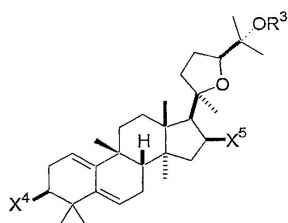
[0148] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 화학식 I의 전형적인 화합물은 도 1에서 나타난 바를 포함하며, 본원에서 **1** (아스트라갈로시드 IV), **2** (시클로아스트라제놀), **3** (아스트라제놀), **4** (아스트라갈로시드 IV 16-온), **6** (시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드), 및 **7** (시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드)로 칭하여진다.

[0149] 또한 3- $\beta$ -D-글리코피라노시드로 치환된 시클로아스트라제놀(**2**)의 백본 구조를 갖는 다른 화합물이 본 발명의 방법에서 사용을 위해 고려된다.

[0150] 바람직하게는, 화합물은 백본 구조의 분리된 탄소에 부착된 총 1 또는 2개의 글리코시드를 포함한다(즉, 1개의 글리코시드는 추가적 글리코시드에 부착되지 않음). 예는 천연 발생 화합물 아스트라갈로시드 A, **1**, **2**, 및 **7**, 및 아스트라베루신(astraverrucins) I 및 II(*Astragalus verrucosus*로부터 단리될 수 있음)를 포함한다.

[0151] 본 발명은 또한 하나 이상의 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공하는데, X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup> 중 하나는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토로부터 선택되고, 나머지는 1개의 글리코시드이다. 추가적 구체예에서, 화합물은 **6** 및 **7**로 칭하여진 것으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 약학적 조성물은 화학식 I의 화합물을 포함하는데, X<sup>3</sup>는 케토이며, 한 구체예에서, 화합물은 **4**로서 칭해진 화합물이다.

[0152] 다른 양태에서, 본 발명은 화학식 II에 의해 표현되는 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.



[0153]

[0154] 화학식 II에서, 각각의  $X^4$  및  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고, OR<sup>3</sup>는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되며; 이때 "글리코시드" 및 그것의 각종 구체예는 상기 설명되는 바와 같다. 상기 지적되듯이, 화합물은 최대 3개의 글리



코시드, 더 바람직하게는 최대 2개의 글리코시드를 포함한다. 선택된 구체예에서, 화합물은 0, 1, 또는 2개의 글리코시드를 포함하며, 이들 중 어느 것도 추가적 글리코시드로 치환되지 않는다.

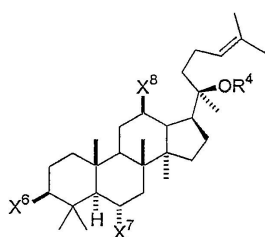
[0155] 화학식 II의 선택된 구체예에서,  $X^4$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택된다. 추가적 구체예에서, 각각의  $X^4$ ,  $X^5$ , 및  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 글루코피라노시드, 및 실로피라노시드로부터 독립적으로 선택된다.

[0156] 화학식 II의 추가적 구체예에서, 각각의  $X^4$  및  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드, 바람직하게는 D-실로피라노시드 또는 D-글루코피라노시드로부터 선택되고,  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토(=O)로부터 선택된다. 바람직하게는, 이들 구체예에서,  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 및 저급 아실옥시로부터 선택되고 더 바람직하게는 히드록시이다.

[0157] 화학식 II의 추가적 구체예에서, 각각의  $X^4$ ,  $X^5$ , 및  $OR^3$ 는 독립적으로 OH 또는 글리코시드, 예를 들어 D-실로피라노시드 또는 D-글루코피라노시드이다. 여전히 추가적인 구체예에서,  $X^4$ 는 OH 또는 1개의 글리코시드이며, 각각의  $X^5$  및  $OR^3$ 는 OH이다. 한 구체예에서, 각각의  $X^4$ ,  $X^5$ , 및  $OR^3$ 는 OH이다. 이 화합물(공식적으로 20R, 24S-에코시-3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 25-트리히드록시-9 $\beta$ -메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔)은 본원에서 5로서 칭해진다.

[0158] 본 발명은 또한 상기 화학식 II의 화합물을 제공하는데, 각각의  $X^4$  및  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고,  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되며, 상기 글리코시드 상의 어떤 히드록실 기는 추가적 글리코시드, 저급 알킬, 또는 저급 아실로 치환될 수도 있다. 선택된 구체예에서, 화합물은 0, 1, 또는 2개의 글리코시드를 포함한다. 바람직하게는, 각각의 상기 글리코시드가 존재하는 경우 D 배열이다. 추가적 구체예에서, 각각의  $X^4$  및  $OR^3$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 선택되고,  $X^5$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 케토(=O)로부터 선택된다. 여전히 추가적인 구체예에서,  $X^4$ 는 OH 또는 글리코시드이고, 각각의  $X^5$  및  $OR^3$ 는 OH이다. 한 구체예에서, 각각의  $X^4$ ,  $X^5$ , 및  $OR^3$ 는 OH이며, 상기 화합물은 본원에서 5라고 칭해진다.

[0159] 추가적 양태에서, 본 발명은 화학식 III의 단리 화합물의 제형을 세포 또는 조직과 접촉시킴으로써, 세포 또는 조직 내 텔로머라제를 증가시키는 방법을 제공한다. 또한, 방법은 텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 세포 또는 조직을 동정하는 단계를 포함할 수도 있다.



III

[0160]

[0161] 화학식 III에서, 각각의  $X^6$ ,  $X^7$ ,  $X^8$  및  $OR^4$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 케토, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 "글리코시드" 및 그것의 구체예는 상기 정의된 바와 같다. 바람직하게는, 화합물은 최대 2개의 글리코시드, 더 바람직하게는 최대 1개의 글리코시드를 포함하며, 이들 중 어느 것도 추가적인 글리코시드로 치환되지 않는다. 바람직한 글리코시드는 D-글루코피라노시드 및 D-실로피라노시드를 포함한다.

[0162] 구조식 III의 선택된 구체예에서, 각각의  $X^6$ ,  $X^7$ ,  $X^8$  및  $OR^4$ 는 히드록시, 저급 알콕시, 저급 아실옥시, 및 1개의 글리코시드로부터 독립적으로 선택되고, 바람직하게는 히드록시 및 1개의 글리코시드로부터 선택된다.

[0163] 구조식 III의 추가적 구체예에서, 각각의  $X^8$  및  $OR^4$ 는 OH이고, 각각의  $X^6$  및  $X^7$ 은 히드록실 및 1개의 글리코시드, 예를 들어,  $\beta$ -D-글루코피라노시드로부터 독립적으로 선택된다. 추가적 구체예에서,  $OR^4$ 는 OH이다.

바람직하게, 각각의  $X^6$  및  $X^8$ 은 또한 OH이며,  $X^7$ 은 글리코시드이다. 구조식 III의 전형적인 화합물은 진세노시드 RH1이며, 본원에서 8로서 칭해진다.

[0164] III. 화학식 I-III의 화합물의 공급원 및 합성

[0165] 화학식 I, II 및 III의 화합물은 일반적으로 천연 발생 재료로부터 단리 또는 합성될 수 있다. 예를 들어, 아스트라갈로시드 I-VII는 예를 들어 문헌[A. Kadota et al., JP Kokai No. 62012791 A2 (1987)]에서 설명되는 바와 같이 *Astragalus membranaceus* 뿌리로부터 단리될 수 있다. 본원에서 보고되는 바와 같이, 이로운 약용 식물의 각종 공급원으로부터 상업적으로 이용가능한 뿌리 조직(8 kg)을 MeOH로 환류시키고, 농축 추출물(200 g)을 MeOH에 재용해시키고 용리제로서 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 혼합물을 사용하여, 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피에 의해 분류시킨다. 각각의 분류를 유사한 용매 혼합물을 사용하여 실리카겔 상에서 역전 크로마토그래피에 의해 작업하여 하기의 적절한 양의 단리 화합물을 제공하였다: 아세틸아스트라갈로시드 I (0.2 g), 아스트라갈로시드 I (3.5 g), 이소아스트라갈로시드 I (0.3 g), 아스트라갈로시드 II (2.3 g), 아스트라갈로시드 III(1.0 g), 아스트라갈로시드 IV (0.8 g), 아스트라갈로시드 V (0.1 g), 아스트라갈로시드 VI (0.3 g), 및 아스트라갈로시드 VII (0.1 g) 또한 문헌[Kitagawa et al., Chenu. Phare. Bull. 31 (2): 698-708 (1983b)]를 참조하시오.

[0166] 또한 아스트라갈로시드 IV (본원에서 1로 칭해짐)는 또한 본 저자에 의한 문헌[Ai Chunmei, Chengdu 610041, P. R. China]로부터 얻었다.

[0167] 시클로아스트라제놀 (2)는 메탄올 HCl과 함께 아스트라갈로시드 IV (1)의 처리에 의해 제조한 후, 중성화, 표준 작업, 및 크로마토그래피에 의한 정제를 하기 실험 단락(실시예 1)에 설명되는 바와 같이 수행하였다. 시클로아스트라제놀은 또한 문헌 [P-H Wang et al., J. Chinese Chem. Soc 49 : 103-6 (2002)]에 의해 설명되는 바와 같이 *Astragalus membranaceus*의 부탄올 추출물의 산화적 분해(산소를 나트륨 원소로 처리)에 의해 획득할 수 있다. 아스트라제놀(3) 및 시클로아스트라제놀(2)은 또한 문헌[Kitagawa et al., Chez. Pharm. Bull. 31 (2): 689-697 (1983a)]의 과정에 따라서 획득될 수 있다.

[0168] 본원에서 6 (시클로아스트라제놀6-β-D-글루코피라노시드) 및 7 (시클로아스트라제놀 3-β-D-실로피라노시드)로 칭해지는 화합물은 메탄올 중 아스트라갈로시드 IV (1) 및 황산의 용액을 환류시킴에 의해 얻은 후, 표준 작업 및 실리카겔 크로마토그래피를 하기 실험 단락(실시예 2)에 설명되는 바와 같이 수행하였다. 또한 재배열 생성물 5 및 아글리콘, 즉 시클로아스트라제놀(2)을 얻었다.

[0169] 16-케토 화합물 4를 아스트라갈로시드 IV의 글리코시드 히드록실 기의 아세틸화 후, 16-히드록실의 피리미디늄 클로로코로메이트 산화, 및 수소화붕소 나트륨에 의한 처리에 의한 글리코시드 히드록실의 복원에 의해 제조하였다.(상기 인용되는 문헌[Kitagawa et al., 1983b] 참조).

[0170] 화학식 I-III의 각종 구체예의 제조, 예를 들어 알킬화 또는 아실화의 다양한 정도를 갖는 화합물, 또는 케토기는 천연 발생 및/또는 필요한 만큼 생성물의 분리를 갖는 시클로아스트라제놀, 아스트라제놀, 아스트라갈로시드 또는 아스트라베리신, 또는 파나사트리올과 같은 상업적으로 이용가능한 출발 물질을 사용하여, 유기 합성의 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 몇가지 실시예가 하기 실험 단락에 주어진다. 예를 들어, 덜 입체적으로 저지된 3-, 6-, 및/또는 16-히드록실 기는 일반적으로 예를 들어, 아실화에 의해 선택적으로 수정될 수 있다. 바람직하다면, 미반응 히드록실 기를 후속하여 예를 들어, 알킬화에 의해 각각 수정한 후, 아실 기의 선택적인 제거를 할 수 있다. 융합 시클로프로필 고리(예를 들어, 시클로아스트라제놀)를 갖는 화학식 I의 화합물은 황산 처리에 의해 19-메틸 기 및 9-11 이중 결합(예를 들어, 아스트라제놀)을 갖는 화합물로 전환될 수 있다. 이 반응은 하기 실시예 9B 및 10B의 반응에서 보이는 바와 같이 탈글리코실화에 의해 수반될 수도 있다.

[0171] IV. 생물학적 활성의 결정

[0172] A. TRAP 분석 프로토콜

[0173] 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기 위한 화합물의 능력은 당업계에 공지되어 있는 TRAP(Telomeric Repeat Amplification Protocol) 분석을 사용하여 결정될 수 있다(예를 들어, Kim et al., U. S. Patent No. 5,629, 154; Harley et al., 미국 특허 제5,891, 639호). 본원에서 사용되는 바와 같이, "TRAP 분석에 있어서 측정된 바와 같은 텔로머라제 활성"은 하기 프로토콜에 따라서 케라티노사이트 또는 섬유아세포에서 측정된 바와 같은 텔로머라제 활성을 나타낸다. 활성은 전형적으로 이러한 세포의 대조군 분석에서 유사하게 측정된 활성에 비교된다(예를 들어, 용매 대조군에서 관찰된 텔로머라제 활성 최소 50%).

[0174] 상기 분석에서의 사용상 적합한 셀라인, 바람직하게는 정상 사람 섬유아세포(NHF) 또는 정상 사람 케라티노사이

트(NHK)는 예를 들어,

[0175] OR 포틀랜드 캐스캐이드 바이오로지스 또는 벨기에 스네프 4C 바이오테크 또는 ATCC(아메리칸 타입 컬처 콜렉션)와 같은 상업적 공급원으로부터 얻을 수 있다. ATCC 웹사이트 상에 위치할 수 있는 ATCC 정상 사람 섬유 아세포 셀라인은 예를 들어, CCL135, CCL137, 및 CCL151을 포함한다.

[0176] 세포를 이틀 동안 성장 배지(예를 들어, 캐스캐이드 바이오로지스 인코포레이션에 의해 공급되는 Epi-Life 배지 + 케라티노사이트성장 인자 보충 + 60 mM CaCl<sub>2</sub>)에서 약 500 셀/웰에서 평판배양시킨다. 95% 에탄올 또는 DMSO와 같은 적합한 용매 중 테스트 조성물을 일정 범위의 농도에서 선택된 웰에 첨가하고 16-24 시간 동안 배양시킨다. 본원에서 보고된 데이터를 위해, 사용된 용매는 DMSO였다.

[0177] 셀이 존재하는 용액을 5.0mL DNase-, RNase-유리 H<sub>2</sub>O(DNase-, RNase-유리 수는 DEPC(디에틸피로카르보네이트) 처리에 의해 생성되거나 Sigma와 같은 판매처로부터 구입할 수도 있음)에 3.0mL Nonidet<sup>®</sup> P40, 1.0mL CHAPS 용해 버퍼(하기 참조), 및 1.0mL10X TRAP 버퍼(하기 참조)의 첨가에 의해 제조된다.

[0178] 처리된 세포의 형태학은 현미경아래서 우선 관찰되어 불규칙한 성장의 어떤 시각적 흔적도 없음을 확인한다. 배지를 웰로부터 제거하고, 세포를 PBS(Ca 및 Mg 없음)에 2번 행군다. 접시를 바람직하게는 얼음 위에서 차게하고, 세포 용해 버퍼(하기 참조)를 첨가하고(약 100  $\mu$ l/웰) 몇차례 피펫을 위아래로 하여 분말화한다. 세포를 1시간 동은 얼음위에서 배양시킨다.

#### CHAPS 용해 버퍼

| 저장                                | 1 mL에 대하여             | 최종 농도   |
|-----------------------------------|-----------------------|---------|
| 1 M Tris-HCl pH 7.5               | 10 $\mu$ l            | 10 mM   |
| 1 M MgCl <sub>2</sub>             | 1 $\mu$ l             | 1 mM    |
| 0.5 M EGTA                        | 2 $\mu$ l             | 1 mM    |
| 100 mM AEBSF                      | 1 $\mu$ l             | 0.1 mM  |
| 10% CHAPS <sup>a</sup>            | 50 $\mu$ l            | 0.5%    |
| BSA                               | 1 mg                  | 1 mg/ml |
| 100% 글리세롤                         | 100 $\mu$ l           | 10%     |
| DNase-, RNase-유리 H <sub>2</sub> O | 936 $\mu$ l (1 mL 까지) |         |

[0179]

[0180] <sup>a</sup> CHAP 세제를 용해 버퍼를 사용하기 직전에 첨가한다. 또한, AEBSF(4-(2-아미노에틸)-벤젠설포닐 플루오리드 HCl)을 추출 단계 직전에 용해 버퍼에 첨가한다.

#### 10X TRAP 버퍼

| 저장                             | 5 mL에 대하여   | 최종 농도   |
|--------------------------------|-------------|---------|
| 1M Tris-HCl, pH 8.3            | 1 ml        | 200 mM  |
| 1M MgCl <sub>2</sub>           | 75 $\mu$ l  | 15 mM   |
| 1M KCl                         | 3.15 ml     | 630 mM  |
| Tween 20 (Boehringer Mannheim) | 25 $\mu$ l  | 0.5%    |
| 0.1M EGTA                      | 500 $\mu$ l | 10 mM   |
| 20 mg/ml BSA                   | 250 $\mu$ l | 1 mg/ml |

[0181]

[0182] 하기 물질을 마스터 PCR 혼합물을 생성하기 위해 조합시킨다.

| 저장                                   | 반응 당 (40 $\mu$ l)              | 최종 농도 <sup>a</sup> |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| 10X TRAP 버퍼                          | 5.0 $\mu$ l                    | 1X                 |
| 2.5 mM dNTPs                         | 1.0 $\mu$ l                    | 50 $\mu$ M         |
| Cy5-TS 프라이머 (0.1 mg/ml)              | 0.2 $\mu$ l                    | 0.4 ng/ml          |
| ACX 프라이머 (0.1 mg/ml)                 | 1.0 $\mu$ l                    | 2 ng/ml            |
| TSU2 Int. Std. (1 pg/ml)             | 1.0 $\mu$ l                    | 20 fg/ml           |
| U2 프라이머 (0.1 mg/ml)                  | 1.0 $\mu$ l                    | 2 ng/ml            |
| Taq <sup>™</sup> 폴리머라제 (5U/ $\mu$ l) | 0.4 $\mu$ l                    | 2 유닛               |
| DNase-, RNase-유리 H <sub>2</sub> O    | 30.4 $\mu$ l (총 40 $\mu$ l 까지) |                    |

[0183]

[0184] <sup>a</sup> 40 $\mu$ l PCR 혼합물 +10 $\mu$ l 세포 용해물 = 50 $\mu$ l의 최종 농도를 기초로 함.



- [0185] PCR 혼합물은 하기 구성성분을 포함한다: Cy5-TS 프라이머, 서열 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3' (SEQ ID NO: 1)를 갖는 5'-Cy5 표지된 올리고뉴클레오타이드는 텔로머라제 기질이다. 배지의 텔로머라제 활성화에 의존하여, 텔로머라제 반복(서열..AGGGTT..을 가짐)이 기질에 첨가되어 텔로머라제 연장 생성물을 형성하고, 또한 텔로머라제 생성물 또는 TRAP 생성물이라 언급될 것이다. 서열 5'-GCG CGG CTT ACC CTT ACC CTT ACC CTA ACC-3' (SEQ ID NO: 2)을 갖는 ACX 프라이머는 텔로머라제 연장 생성물을 혼성화하는 고정된 리턴 프라이머이다.
- [0186] TSU2 내부 표준, 서열 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT AAA AGG CCG AGA AGCGAT-3'; SEQ ID NO:3)을 갖는 올리고뉴클레오타이드인 TS 프라이머 서열의 확장을 정량적 목적을 위해 억제된 소량으로 첨가한다. 서열 5'-ATC GCT TCT CGG CCT TTT (SEQ ID NO:4)을 갖는 U2 프라이머를 3' 영역의 내부 표준에 혼성화하기 위한 리턴 프라이머라 칭하여 진다.
- [0187] 세포 용해물의 샘플(10  $\mu$ l)를 반응 튜브 내 40 $\mu$ l의 이 PCR 혼합물에 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 실온(30℃)에서 배양한다. PCR을 배양되는 시간에 대한 하기 시간에서 혼합물을 배양시킴으로써 수행하고: 94℃/30초, 60℃/30초, 및 72℃/30초; 20-30, 바람직하게는 31 사이클을 수행하기 위해 이 3-단계 사이클을 반복한다.
- [0188] 예를 들어, 브로모페놀 블루 및 크실렌을 함유하는 부하 염료를 첨가하고, 브로모페놀 블루가 겔을 녹일때까지, 샘플을 0.6x TBE 중 10-15% 비-변성 PAGE 받게 한다. 생성물 형성은 예를 들어, CY5-표지된 텔로머라제 생성물의 검출을 위한 형광영상기를 사용하여 관찰된다(650 nm의 최대 여기; 670 nm의 최대 방출).
- [0189] 증폭 후 TSU2 내부 표준의 최종양은 일반적으로 50 $\mu$ l 반응 혼합물 당 5-10 amol이다. 이 내부 억제는 첫번째 텔로머 부가 생성물(즉, TS 올리고뉴클레오타이드에 대한 하나의 텔로머 첨가의 생성물, 이후 ACX 리턴 프라이머를 이용하여 증폭됨)을 하기 겔 상의 뚜렷한 밴드로서 나타나는 특이적인 36-mer PCR 증폭 생성물을 제공한다. 이 내부 억제 밴드는 상이한 샘플로부터 PCR 증폭을 표준화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0190] 상기 분석에서 발생하는 텔로머라제 생성물 분자(TM)의 상대적인 수가 하기 식에 따라 결정된다:
- [0191] 
$$TM = (T_{TRAP \text{ 생성물}} - T_{BKD1}) / (T_{Int \text{ Std}} - T_{BKD2})$$
- [0192] 상기식에서:  $T_{TRAP \text{ 생성물}}$ 은 모든 텔로머라제 생성물에 대하여 겔상에서 측정된 총 세기이며,  $T_{BKD1}$ 은 텔로머라제 생성물에 의해 수반되는 크기의 부위 당량에 대한 블랭크 레인에서 측정된 배경 세기이고,  $T_{Int \text{ Std}}$ 는 내부 표준 밴드에 대한 세기이며,  $T_{BKD2}$ 는 내부 표준 밴드에 의해 수반되는 크기의 부위 당량에 대한 블랭크 레인에서 측정된 배경 세기이다. 결과의 수는 주어진 배양 시간에 대하여 발생된 텔로머라제 생성물의 분자의 수이며, 이것은 TM을 결정하기 위한 목적을 위해, 본원에서 30분이라 지칭된다.
- [0193] 상기 설명되는 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 바람직한 화합물은 1  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서, 용매 대조군에서 보이는 이러한 활성의 수준 보다 적어도 25% 이상에서 섬유아세포 또는 케라티노사이트의 텔로머라제 활성의 수준을 생성할 수 있다. 더 바람직하게, 화합물은 1  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서, 용매 대조군에서 보이는 이러한 활성의 수준 보다 적어도 50% 이상에서 텔로머라제 활성을 생성할 수 있다. 보다 더 잠재적인 활성은 예를 들어, 1  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서, 설명된 TRAP 분석에서 측정된 바와 같이 용매 대조군에서 보이는 이러한 활성의 수준 보다 적어도 약 75%, 100% 또는 500% 더 큰 텔로머라제 활성을 생성하는 화합물과 같이, 어떠한 적용을 위해 적절할 수도 있다.
- [0194] B. 전형적인 TRAP 분석 결과
- [0195] 텔로머라제 활성을 증가시킴에 있어서 유효성은 각종 농도에서 상기 화학식 I의 화합물에 대하여 평가되었다. 분석은 상기 설명되는 프로토콜에 따라서, HEKneOP 세포(신생아 케라티노사이트)에서 수행되었다. DMSO 중 약 0.03  $\mu$ M 내지 10  $\mu$ M에 이르는 농도.
- [0196] 도 2에서 나타내는 바와 같이, 화합물 1(아스트라갈로시드 IV)을 함유하는 조성물에 대하여, 텔로머라제 활성은 1.0  $\mu$ M에서 약 360%의 억제까지 증가하는 농도와 함께 증가하였으며, 이어서 농도가 추가적으로 10  $\mu$ M까지 증가하는 바와 같이 감소하였다. 도 2에서 나타낸 바와 같이, 2(시클로아스트라제놀)를 함유하는 조성물에 대하여, 텔로머라제 활성은 0.1  $\mu$ M에서 약 300%의 억제로 증가하였으며(10 nM EGF(표피 성장 인자)로 처리된 세포 내 약 200%와 비교됨), 이후 농도의 추가적 증가와 함께 감소하였다.
- [0197] 도 1A-G에 나타낸 각 화합물을 함유하는 조성물에 대하여, 표 1은 DMSO 대조군(즉 100% 이상)에서 보인 2배의 텔로머라제 활성의 수준을 생성하는 화합물의 최소 유효 농도(MEC)를 제공한다.

표 1

[0198]

| 칭호 | 명칭   | MEC, $\mu\text{M}$ |
|----|--|--------------------|
| 1  | 아스트라갈로시드 IV  | 0.01               |
| 2  | 시클로아스트라제놀  | 0.01               |
| 3  | 아스트라제놀   | 0.03               |
| 4  | 아스트라갈로시드 IV 16-온   | 0.03               |
| 5  | 20R, 24S-에폭시-3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 25-트리히드록시-9 $\beta$ -메틸-19-노르라노스트-1,5-디엔 | 0.10               |
| 6  | 시클로아스트라제놀 6- $\beta$ -D-글루코피라노시드   | 3.2                |
| 7  | 시클로아스트라제놀 3- $\beta$ -D-실로피라노시드  | 3.2                |
| 8  | 진세노시드 RH1  | 10                 |

[0199]

C. 상처 치료 분석 프로토콜

[0200]

화학식 I-III의 화합물은 하기 더 논의되는 바와 같이, 상처, 화상, 찰과상 또는 표피의 기타 급성 또는 만성 상태의 치료를 촉진하는데 용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "스크래치 분석에서 측정되는 바와 같은 상처 치료 활성"은 하기 프로토콜에 따른 케라티노사이트 또는 섬유아세포에서 측정되는 바와 같은 활성을 나타내며, 하기 식에서 나타낸 WH의 값으로 표현하였다.

[0201]

세포를 플라스크(플라스크 당  $5 \times 10^5$  세포)에서 평반배양시키고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 습한 챔버 내에서 2일 동안 배양시킨다. "상처"를 생성하기 위해, 2 ml 플라스틱 피펫을 부드럽게 훑어서 세포 표면에 "스크래치"하였다. 이상적인 상처는 약 2-3 nm 폭 및 50 nm 길이(조직 배양 플라스크의 긴 축을 따라서)이다. 세포를 비히클(DMSO; 대조군 샘플) 또는 여러가지 농도의 테스트 조성물을 함유하는 배지로 재처리시킨다. 상처 부위를 동정하고, 플라스크를 표시하고, 세포의 외관을 세포의 3-4일 계속된 배양에 걸쳐서 사진으로 기록하였다.

[0202]

상처 봉합의 양은 비히클-처리 또는 기타 대조군 세포에 비하여 화합물-처리된 샘플에 대한 시간에 걸친 상처의 폭을 측정함으로써 결정된다. 측정은 1(스크래칭 후 즉시), 2, 3, 및 4일에 각 샘플에 대하여 얻은 사진으로부터 이루어진다. 상처 치료의 퍼센트(또한 "상처 치료 활성"으로서 표현됨)은 하기 식에 의해 계산된다:

[0203]

$$WH = 100 - [100 \times W_n/W_0],$$

[0204]

상기식에서  $W_n$ 은 n일째의 상처의 폭이고  $W_0$ 는 1일의 상처의 폭이다(즉 스크래칭 직후).

[0205]

상기 설명되는 바와 같이 화학식 I-III의 바람직한 화합물은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서, 미처리 또는 대조군 세포에서 보이는 적어도 25% 이상인 상기 설명되는 바와 같은 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 스크래치 분석에서 상처 봉합의 양(상처 치료 활성)을 생성할 수 있다. 보다 더 잠재적인 활성은 예를 들어, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서, 미처리 또는 대조군 세포에서 보이는 적어도 약 50% 또는 100% 이상인 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 스크래치 분석에서 상처 봉합의 양을 생성하는 화합물과 같은 어떠한 적용을 위해 적절할 수 있다.

[0206]

D. 전형적인 스크래치 분석 결과

[0207]

발명 화합물 1(아스트라갈로시드 IV) 및 2(시클로아스트라제놀)의 상처 치료 활성이 상기 설명되는 바와 같은 스크래치 분석을 통하여 노화 케라티노사이트에서 평가되었다. 전형적인 분석의 결과가 도 4에 나타나는데, 여기서 이미지의 상단 열은 대조군 세포(용매, DMSO로 처리됨)을 나타내고, 하단 열은 동일한 용매에서 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.13  $\mu\text{M}$ ) 1로 처리된 세포를 나타낸다. 처리된 세포는 대조군 세포와는 반대로 4일에 융합되었으며, 이때 4일에 상당한 크기의 "상처"를 남겼다. 유사한 결과가 이러한 조성물 및 도 5에서 나타낸 바와 같은 젊은 케

라티노사이트의 0.01  $\mu\text{M}$  2(시클로아스트라제놀)와 함께 나타났다.

[0208] 도 6은 올리고뉴클레오타이드(GRN163)를 억제하는 텔로머라제 및 대조군 올리고뉴클레오타이드(GRN137227)의 존재 또는 부재하에서, 유사한 분석에서 측정되는 바대로, 노화 성인 케라티노사이트 중 1(아스트라갈로시드 IV)를 함유하는 조성물의 상처 치료 활성을 나타낸다. 나타낸 바와 같이, 올리고 GRN163을 억제하는 텔로머라제는 1 조성물의 상처 치료 효과를 방해하고; 대조군 올리고 GRN137226의 효과는 최소이다. (GRN163은 텔로머라제 RNA 구성성분의 주형 영역을 표적하는 텔로머라제 억제제 올리고뉴클레오타이드이다. 구체적으로, GRN163은 PCT 공개 번호 제 WO 01/18015호에서 상세히 설명된 13-mer N3'→P5' 티오포스포라미데이트 올리고뉴클레오타이드이다. GRN137227은 1개의 잘못 매칭된 서열을 갖는 13-mer N3'→P5' 티오포스포라미데이트 대조군 올리고뉴클레오타이드이다.)

[0209] 하기 표 2는 상기 화학식을 사용하여 그 분석의 결과를 기초로 하여 도 5 및 6에서 나타낸 스크래치 분석법에서 사용된 화합물 1 및 2에 대한 WH 값(상처 치료 활성)을 나타낸다.

표 2

|        | 대략적 상처 폭(임의의 단위) |        |        |        | WH대조군 | WH테스트 |
|--------|------------------|--------|--------|--------|-------|-------|
|        | 대조군 1일           | 대조군 4일 | 테스트 1일 | 테스트 1일 |       |       |
| 도 4(1) | 22               | 10     | 17     | 0      | 54.5  | 100   |
| 도 5(1) | 19               | 9      | 18     | 0      | 52.6  | 100   |
| 도 5(2) | 19               | 9      | 21     | 2      | 52.6  | 90.5  |

[0211] 도 7은 텔로머라제 억제제(GRN163)의 존재 및 부재하에서, 및 50 ng/mL(약 2 mL) PDGF(혈소판 유도 성장 인자)와 비교하여, 노화 신생아 케라티노사이트 내 발명 화합물 1(아스트라갈로시드 IV)에 대한 억제 퍼센트로서 상처 봉합을 도식적으로 설명한다. 나타낸 바와 같이, 1의 유효성은 PDGF의 것과 필적하였으며, GRN163의 첨가에 의해 다시 방해되었다.

## [0212] V. 추가적 화합물의 선택

[0213] 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 바와 같은 TRAP 분석에서 화학식 I, II, 또는 III의 화합물의 유도체를 스크리닝함으로써, 텔로머라제 활성을 증가시키기에 효과적인 추가적 화합물을 선택하는 방법을 제공한다. 이 양태에서, "유도체"는 하기 방법 중 하나이상에서 화학식 I, II, 또는 III의 화합물의 변형에 의해 생성된 화합물을 포함한다: 저급 알킬 카르바메이트, 할로젠, 티올, 저급 알킬 티오에테르, 아미노, 저급 알킬아미노, 저급 알킬아미드, 알데히드, 또는 케토 기로의 히드록시 기의 전환; 이러한 알데히드 또는 케토 기, 또는 존재 케토 기에 대한 저급 알킬 기의 첨가(예를 들어, 추가적 히드록실 기의 형성을 포함하는 알킬화); 탄소-탄소 이중 결합에 대한 할로젠, 히드록실, 및/또는 수소의 첨가; 히드록실 기의 제거(즉, 수소에 대한 전환); 및 하나 이상의 키랄 중심, 바람직하게는 산소를 지니는 키랄 센터에서 입체화학의 전도. 본원에서 사용되는 바와 같이, 이러한 변형(들)에 의해 생성된 "유도체"는 상기 설명된 바와 같은 화학식 I, II 및 III 그들 자체의 화합물을 제외한다.

[0214] 모든 이들 변형은 핵친화성 친핵성 치환과 같은 주지의 합성 반응을 이용하여 표준 합성 방법을 사용하여 완수될 수 있는데, 이는 예를 들어, 토실레이트; 에스터화; 알킬화; 산화; 환원; 할로겐화; 수화; 수소화 등과 같은 더 좋은 이탈기에 대하여 히드록실 기의 전환을 포함한다.

[0215] 하나 이상의 농도에서 적합한 용매 배제에서 제형된 화학식 I, II, 또는 III의 화합물의 유도체가 상기 설명된 바와 같은 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 TRAP 분석에서 스크리닝된다. 선별을 위한 바람직한 유도체는 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도의 용매에서 제형되는 경우 상기 용매로 처리된 상기 세포에서 측정된 적어도 50% 이상이 TRAP 분석에서 측정된 바와 같은 케라티노사이트 또는 섬유아세포의 텔로머라제 활성의 수준을 생성하기에 효과적인 것을 포함한다.

[0216] 선택적으로, 또는 추가적으로, 하나 이상의 농도에서 적합한 용매 배지에서 제형된 화학식 I, II, 또는 III의 유도체가 상기 설명된 바와 같은 스크래치 분석의 상처 치료 활성에 대하여 분석된다. 선별을 위한 바람직한 유도체는 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서 용매 대조군의 것에 대하여 적어도 25% 이상, 및 더 바람직하게는 적어도 50% 이상에서 상처 치료 활성을 갖는 것을 포함한다.

## [0217] VI. 치료상의 지시 및 치료 방법

- [0218] 본 발명은 세포 또는 조직을 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 유효한 양으로, 상기 단락 II에서 개시된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 단리 화합물의 제형과 접촉시킴으로써, 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 방법은 증가 텔로머라제 활성이 바람직한 세포 또는 조직을 동정하는 사전 준비 단계를 포함할 수도 있다. 세포는 배양 중 즉, 시험관 내 또는 생체 외, 또는 생체 내 피험체 또는 환자 내일 수도 있다.
- [0219] 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성의 증가로부터 실현되는 이득은 예를 들어, 접촉되는 세포의 복제 역량 및/또는 수명의 증가를 포함한다. 방법은 환자의 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성의 증가가 바람직한 피험체 또는 환자의 진단 조건을 더 포함할 수도 있는데, 예를 들어, 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성의 증가에 의한 처리를 받는 질병을 진단하는 것. 따라서, 본 발명은 상기 환자의 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시킴으로써 환자의 상태를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 상기 단락 II에서 개시된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 화합물의 유효량을 이러한 처리가 필요한 피험체에 투여하는 것을 포함한다. "유효량"은 치료적 결과가 달성되는 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키기에 유효한 양을 나타낸다.
- [0220] 이러한 상태는 예를 들어, 세포 노쇠 또는 텔로머라제의 부재하에서 세포의 증가된 증식율과 관련한 상태를 포함할 수도 있는데, 이는 가속화된 텔로미어 반복 손실을 야기한다. 용어 "증가된 증식율"은 그 세포 유형의 정상 세포와 비교하여, 또는 그 세포의 다른 개체 내 정상 세포와 비교하여 더 높은 비율의 세포 분화를 의미한다. 비정상적으로 이른 나이에 세포의 그들 기의 노쇠는 갑작스럽게 질병을 야기할 수 있다(West et al., 미국 특허 제 6,007,989 호 참조).
- [0221] 특정 세포 유형에서 텔로머라제 활성이 증가가 이로울 수 있는 각종 질병상태가 존재한다. 따라서, 본 발명은 상기 설명되는 바와 같은 화학식 I, II, 또는 III의 화합물의 유효량을 이러한 치료가 필요한 피험체에 투여하는 것을 포함하는 환자의 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시킴으로써, 하기로부터 선택되는 환자 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 경우에 있어서, 상태는 또한 관련 세포 유형(괄호로 나타냄)을 이용하여 하기 더 설명되는 바와 같이 생체 외 세포 치료에 의해 치료 받을 수도 있다.
- [0222] (a) 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 및 발작(뉴런, 아교세포, 예를 들어, 성상세포, 내피 세포, 섬유아세포를 포함하는 중추 신경계의 세포),
- [0223] (b) 예를 들어, 피부 위축 및 얇아짐, 탄력섬유용해 및 피부 주름, 피지선 과다형성 또는 형성부전, 노인성 흑색점 및 기타 색소 형성 비정상, 머리카락의 노화 및 머리카락 손실 또는 얇아짐, 또는 만성 피부 궤양(섬유아세포, 피지선 세포, 멜라노사이트, 케라티노사이트, 랑게한스 세포, 미세혈관 내피 세포, 머리카락 난포 세포),
- [0224] (c) 퇴행성 관절 질병(예를 들어, 연골세포 및 열공 및 활액 섬유아세포와 같은 관절의 연골조직의 세포),
- [0225] (d) 골다공증 및 골격 시스템의 기타 퇴행성 상태(골격 시스템의 세포, 예를 들어 골아세포, 골수 스트로마 또는 중간엽 세포와 같은 것),
- [0226] (e) 죽상경화증, 석회화, 혈전증, 및 동맥류를 포함하는 혈관 시스템의 연령- 및 스트레스-관련 질병(내피 세포, 민무늬근 세포, 및 외래의 섬유아세포를 포함하는 심장 및 혈관 시스템의 세포),
- [0227] (f) 연령-관련 반상 퇴행(눈의 세포, 예를 들어, 착색된 상피 및 혈관 내피 세포),
- [0228] (g) AIDS(HIV-제한  $CD8^+$  세포); 및
- [0229] (h) 천연의 노화, 암, 암 치료, 급성 또는 만성 감염과 함께, 또는 가속화된 세포 재편성을 야기하는 유전 질환과 함께 발생하는 조직 재편성의 손상, 및 관련 빈혈증 및 기타 퇴행성 상태를 포함하는 연령- 및 스트레스-관련 면역계 손상(면역계의 기타 세포로서, 림프, 골수, 및 적혈구 계통의 세포인데, 예를 들어, B 및 T 림프구, 단핵구, 순환 및 특이화 조직 대식세포, 호중성 백혈구, 호산성 백혈구, 호염기성 세포, NK 세포, 및 그들 각각의 아버지).
- [0230] 상기 지적된 세포 유형에 더하여, 텔로머라제 활성의 증가가 치료적으로 이로울 수 있는 추가적 세포 유형은 이에 한정되지는 않지만, 간의 세포, 내분비 및 외분비선, 민근계, 또는 골격근계를 포함한다.
- [0231] 예로써, HIV-감염 개체의 경우에,  $CD8^+$  세포 재편성이 이들 세포 시도와 같이 증가하여 HIV-감염  $CD4^+$  세포의 수 준을 억제한다. AIDS에 있어서(상기 항목(g)), 질병은 HIV-제한  $CD8^+$  세포의 초기 노쇠에 의해 야기되는 것으로 여겨진다. 이러한 세포의 노화는 단순히 세포 배가(doubling) 당 정상적인 양의 텔로머라제 서열의 손실에 대하



여 기여할 뿐 아니라, 또한, 텔로미어 마멸이 세포의 그 그룹에 대한 정상치보다 더 큰 세포의 증가된 복제율에 기여한다. 따라서 본 발명은 상기 단락 II에서 개시된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 화합물의 유효량을 이러한 치료가 필요한 피험체에 투여함으로써, HIV 감염된 피험체를 치료하는 방법, 특히 HIV 감염된 피험체 내 HIV-제한 CD8<sup>+</sup> 세포의 조기 노쇠를 감소시키는 방법을 제공한다.

[0232] 텔로머라제 활성의 증가는 미분화 세포 및 증식 세포, 예를 들어, 심부전 또는 발작 중의 허혈과 같은 스트레스로 인한 세포사에 대하여 증가된 민감성에 연관된 상태에서 이로울 수 있다(예를 들어, Oh 및 Schneider, J Mol Cell Cardiol 34 (7): 717-24; Mattson, ExpGerontol. 35 (4): 489-502 참조). 따라서 본 발명은 상기 단락 II에서 개시된 바와 같이 화학식 I, II 또는 III의 화합물의 유효량을 이러한 치료가 필요한 피험체에 투여하는 것을 포함하는 피험체의 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시킴으로써, 심부전 또는 발작으로 인한 조직 내 허혈 상태를 겪는 피험체와 같은 피험체 내 스트레스 또는 DNA-손상-유도된 세포사를 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 지적되었듯이, 방법은 지시된 상태를 피험체에서 진단하는 사전 준비 단계를 포함할 수도 있다.

[0233] 다른 양태에서, 조성물은 하나 이상의 세포 유형이 그 환자에서 제한되고, 환자의 수명은 복제를 계속하거나 스트레스-유도성 세포사에 저항하기 위한 그들 세포의 능력을 확장함에 의해 확장될 수 있는 개체의 치료를 위해 사용될 수도 있다. 이러한 그룹의 세포의 한 예는 다운증후군 환자에 존재하는 림프구이다. 따라서, 본 발명은 상기 단락 II에서 개시되는 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 화합물의 유효량을 이러한 환자에 투여하는 것을 포함하는 환자의 상기 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시킴으로써, 다운 증후군 환자에 존재하는 림프구의 복제 역량 및/또는 수명을 증가시키는 방법을 제공한다. 조성물은 또한 정상적인 노화동안에 발생하는 스트레스-유도성 세포사에 대한 저항성을 향상시키는데 사용될 수도 있다.

[0234] 발명의 추가적 양태에서, 증가하는 텔로머라제 활성은 상처, 화상, 찰과상 또는 표피의 기타 급성 또는 만성 상태의 치료를 촉진하기에 효과적이다. 따라서, 본 발명은 상기 단락 II에서 개시된 바와 같이 화학식 I, II 또는 III의 단리 화합물의 유효량의 제형을 이러한 치료가 필요한 환자에, 바람직하게는 영향받은 부위에 국소적으로 투여함으로써, 표피의 급성 또는 만성 상태를 치료하는 방법을 제공한다.

[0235] 본원에서 사용되는 바와 같이, "표피의 급성 또는 만성 상태"는 외상, 화상, 찰과상, 외과수술상의 절개, 제공자 이식 부위에서 앓고 있는 손상, 및 전염성 제체에 의해 야기되는 손상과 같은 급성 상태, 및 만성 정맥 궤양, 당뇨 궤양, 압박 궤양, 욕창, 및 점막 표면의 궤양 또는 상처와 같은 만성 상태를 포함한다. 또한 잔류 염증성 상태 또는 감염에 의해, 또는 유전적 결함(예를 들어, 켈로이드 형성 및 응고 비정상)에 의해 야기되는 피부 또는 상피 표면 손상이 포함된다. 예를 들어, PCT 공개 번호 제 WO 02/91999호를 참조하십시오.

[0236] 이러한 치료에 있어서 텔로머라제 활성의 증가의 바람직한 효과는 치료 부위에서의 세포 증식 또는 이동, 표면의 상피화, 존재한다면 상처의 봉합, 또는 정상적인 생리학적 기능의 복구를 포함한다. 용어 치료 부위의 "상피화" 또는 "재상피화"는 적용된 치료의 결과로서 그 부위에서 상피 세포의 밀도의 증가를 의미한다.

[0237] 방법은 또한 이식된 세포의 성장을 증가시키는데 사용될 수도 있다. 이러한 치료에서 텔로머라제 활성의 증가의 바람직한 효과는 치료 부위를 덮음, 이식된 세포의 생존, 면역 거부반응의 결여, 존재한다면 상처의 봉합, 또는 정상적인 생리학적 기능의 복구를 포함한다. 이식된 세포는 치료 과정(예를 들어, 치료된 조직의 일부가 됨)에 있어서 직접 참가함에 의해, 또는 상처를 덮고 그로 인하여 숙주 세포에 의한 치료를 촉진하는 환경을 제공함에 의해 상처 봉합에 참가할 수도 있다.

[0238] 본 발명은 또한 피부의 처치 및 미용상의 향상과 같은 기타의 목적을 위해 피부 표면에서 인지된 어떤 결함의 치유를 고려한다.

[0239] 추가적 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 배양에서, 예를 들어, 생체 외 세포 치료 또는 단일클론 항체 생산에서 세포의 텔로머라제 활성을 증가시킴에 의해 세포의 복제 역량 및/또는 확장된 수명 정도를 증가시키는데 사용될 수 있다. 증가하는 텔로머라제 활성은 텔로머라제 반복 손실을 보임으로써 및/또는 세포 증식 중에 스트레스-유도된 세포사에 대한 저항성을 향상시킴으로써 이러한 세포의 복제 역량을 증가시킨다.

[0240] 생체 외 적용의 경우에 있어서, 상기 설명되는 바와 같이 화학식 I, II 또는 III의 화합물의 유효량을 피험체로부터 얻은 이식 세포에 첨가한다. "유효량"은 세포의 텔로머라제 활성을 증가시키고, 이로써 세포의 복제 역량 및/또는 수명을 증가시키기에 유효한 양을 나타낸다.

[0241] 이식 세포는 예를 들어, 골수 줄기 세포(미국 특허 제 6,007,989호), 골수 스트로마 세포(Simonsen et al., Nat Biotechnol 20(6):592-6, 2002), 또는 부신피질 세포(Thomas et al, Nat Biotechnol 18(1) : 39-

42,2000)와 같은 줄기 세포를 포함할 수도 있다. 상기 항목(a)-(g)에서 지적된 바와 같은 질병 상태는 또한 생체 외 세포-기재 치료를 받을 수도 있다. 예는 근육 영양실조의 치료를 위한 근육 위성 세포, 골다공증의 치료를 위한 골아세포, 연령-관련 반점-변성을 위한 망막 색소 상피 세포, 골관절염을 위한 연골세포 등의 사용을 포함한다.

[0242] 예를 들어, 기능적  $CD8^{+}$  세포가 감염된  $CD4^{+}$  세포의 확장을 억제하기 위해 AIDS 환자에서 제한하는 인지는 치료적 프로토콜이 수정되도록 허용하는데, 여기서 HIV-제한  $CD8^{+}$  세포가 초기 단계의 HIV-감염 개체로부터 제거되는데, 상기 초기 단계는 AIDS가 처음으로 검출되고 은행에 저장되는 때이며, 후속하여 후기 단계의 개체로 재도입되는데, 상기 후기 단계는 더이상 개체가 이용가능한 필수  $CD8^{+}$  세포를 갖지 않는 때이다. 따라서, 개체의 수명은 적절한 시점에서 그 개체의 제한 세포의 계속적 투여를 수반하는 프로토콜에 의해 확장될 수 있다. 이들 적절한 시점은 다음  $CD8^{+}$  세포 노쇠, 또는 그들 세포가 노쇠하는 때의 지표로서, 이러한  $CD8^{+}$  세포 내 텔로머라제 길의 길이를 측정함으로써 측정될 수 있다. 본 발명에 따라서, 저장된 세포는 텔로머라제 반복 손실을 늦추는 제제, 즉, 상기 단락 II에서 개시된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 화합물의 존재하에서 수적으로 확장될 수 있다.

[0243] 따라서, 본 발명은 생체 외 세포 기재 치료의 방법을 제공하는데, 이것은 피험체로부터 세포 증식을 획득하는 단계, 및 생체 외 세포 개체군을 확장하는 단계를 포함하는데, 이때 세포 개체군은 텔로머라제 활성을 증가시키고 이로써 세포 개체군의 복제 역량 및/또는 수명을 증가시키기에 효과적인 양으로 상기 단락 II에서 개시된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 화합물로 처리된다. 방법은 일반적으로 예를 들어 상기 주지된 바와 같이 생체 외 세포 기재 치료법에 의한 치료를 받는 상태를 피험체에서 진단하는 단계를 포함한다.

[0244] 추가적 구체예에서, 본 발명은 줄기 세포 증식의 방법을 제공하는데, 이때 세포 개체군은 텔로머라제 활성을 증가시키고 이로써 세포 개체군의 복제 역량 및/또는 수명을 증가시키기에 효과적인 양으로 상기 단락 II에서 개시된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 화합물로 처리된다.

#### [0245] VII. 투여의 제형 및 방법

[0246] 본 발명은 세포 내 텔로머라제 활성을 증가시키고 및/또는 상처 치료를 촉진하기에 유용한 약학적 조성물을 제조하는 방법을 포함한다. 따라서, 단락 II에서 설명된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 단리 화합물은 약학적 부형제, 및 선택적으로 기타 의학적 제제, 애췌번트 등과 함께 조합되는데, 이것은 활성 및 비활성 성분을 포함할 수도 있다. 조성물은 고체, 반-고체, 동결건조 분말, 또는 액체 투약 형태로서, 예를 들어, 정제, 캡슐, 분말, 서방형 제형, 용액, 현탁액, 에멀전, 좌약, 크림, 연고, 로션, 에어로졸 등과 같은 형태를 취할 수 있다. 제형은 정밀한 투여량의 간단한 투여에 적합한 단위 투약 형태로 제공될 수도 있다.

[0247] 화학식 I, II 또는 III의 단리 화합물은 또한 경구 투여를 위한 식이성 보충제 또는 기능식품으로서 제형될 수도 있다. 기능식품 제형, 또는 경구 약학적 조성물을 위해, 적합한 부형제는 예를 들어, 만니톨, 락토스, 글루코스, 수크로스, 녹말, 셀룰로스, 젤라틴, 스테아르산 마그네슘, 소듐 사카린, 및/또는 탄산 마그네슘과 같은 약학적 등급의 담체를 포함한다. 경구 액체 제형의 사용을 위해, 조성물은 예를 들어, 수성 식염수, 수성 텍스트로스, 글리세롤, 또는 에탄올, 바람직하게는 물 또는 보통의 식염수와 같은 수성 담체 중의 수화에 적당한 고체 또는 액체 형태로 공급되는 용액, 현탁액, 에멀전, 또는 시럽으로서 제조될 수도 있다. 바람직하다면, 조성물은 또한 습윤제, 에멀전화제, 또는 버퍼와 같은 비독성 보조 물질의 소량을 함유할 수도 있다. 화학식 I, II 또는 III의 단리 화합물은 또한 편리하게 이용가능한 바와 같은 존재 기능식품적 제형에 통합될 수도 있으며, 이것은 또한 *Astragalus membranaceus*의 추출물과 같은 약용 식물 추출물을 포함할 수도 있다.

[0248] 상처 치료 또는 표피의 다른 급성 또는 만성 상태의 치료에 있어서 사용을 위해, 화학식 I, II 또는 III의 화합물이 국소 투여를 위해 제형된다. 국소 적용을 위한 비히클은 예를 들어, 로션, 크림, 젤, 연고, 스틱, 스프레이, 또는 반죽과 같은 각종 형태 중 하나 일 수 있다. 이들 생성물 형태는 주지의 방법에 따라 제형될 수 있다. 그들은 이에 한정되지는 않지만, 용액, 에어로졸, 젤, 및 리포솜을 포함하는 각종 유형의 담체를 포함할 수도 있다. 담체는 예를 들어, 수중유 또는 유중수 염기를 갖는 에멀전으로서 제형될 수도 있다. 에멀전에서 사용된 적당한 소수성(지성) 성분은 예를 들어, 식물성 오일, 동물성 지방 및 오일, 합성 탄화수소, 및 에스테르 및 그것의 알콜로서, 폴리에스테르 및 오르가노폴리실록산 오일을 포함하는 것을 포함한다. 이러한 에멀전은 또한 에멀전화제 및/또는 계면활성제로서, 예를 들어, 또한 당업계 공지된 바와 같은 비이온성 계면활성제를 포함하여 불연속적인 상을 연속적인 상 내에 분산 및 현탁시킨다.

- [0249] 국소적 제형은 전형적으로 구조화제, 농후화제 또는 겔화제, 및 완화제 또는 윤활제로부터 선택된 하나 이상의 성분을 함유한다. 자주 사용된 구조화제는 예를 들어, 스테아릴 알콜, 및 글리세릴 에테르 또는 에스테르 및 올리고(에틸렌 산화물) 에테르 또는 그것의 에스테르와 같은 긴 사슬 알콜을 포함한다. 농후화제 및 겔화제는 예를 들어, 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체 및 그것의 에스테르, 폴리아실아미드, 및 아가(agar), 카라제난(carrageenan), 젤라틴, 및 구아 고무(guar gum)를 포함한다. 완화제의 예는 트리글리세리드 에스테르, 지방산 에스테르 및 아미드, 밀랍, 경랍, 또는 카나우바(carnauba)와 같은 왁스, 레시친과 같은 인지질, 및 스테롤 및 그것의 지방산 에스테르를 포함한다. 국소 제형은 예를 들어, 수렴제, 방향, 색소, 피부 침투 강화제, 선스크린 등과 같은 당업계 공지된 기타의 성분을 포함할 수도 있다.
- [0250] 약학적 조성물은 또한 비경구, 경피, 또는 흡입에 의한 투여를 위해 제형될 수도 있다. 전형적으로 비경구 투여를 위한 주사가능 조성물은 예를 들어 살균 생리학적 식염수와 같은 적합한 IV 용액에 활성 화합물을 함유한다. 조성물은 또한 지질 또는 인지질 중, 리포솜 현탁액 내, 또는 수성 에멀전 내 현탁액으로서 제형될 수도 있다.
- [0251] 흡입에 의한 투여를 위해, 활성 화합물은 고체 또는 액체 에어로졸 입자로서 제형된다. 제형은 또한 락토스와 같은 추진제 및/또는 분산제를 포함하여 에어로졸 형성을 촉진할 수도 있다. 경피적 투여를 위해, 활성 화합물은 바람직하게는 경피적 패치에 포함되는데, 이것은 선택된 피부 부위에 화합물의 늦은 전달을 허용하며, 또한 지방성 알콜 또는 글리세롤과 같은 침투 향상 물질을 포함할 수도 있다.
- [0252] 이러한 제형을 위한 제조 방법은 공지되어 있거나 당업계 숙련자에게 명백할 것이며, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (19 Ed., Williams & Wilkins, 1995)]을 참조하십시오. 투여되는 조성물은 표적 세포 또는 조직 내 텔로머라제 활성을 증가시키기 위해 약학적으로 안전하고 유효한 양으로 선택된 화합물의 정량을 함유할 것이다.
- [0253] 바람직하게는, 약학적 또는 기능식품 조성물은 바람직하게는 0.1% 이상, 최대 약 10%, 바람직하게는 최대 약 5%, 및 더 바람직하게는 최대 1%(w/v)로 상기 설명된 바와 같은 화학식 I, II 또는 III의 화합물의 적어도 0.1%(w/v)를 함유한다. 적당한 농도의 선택은 예를 들어 바람직한 투여량, 빈도 및 활성 성분의 송달의 방법과 같은 인자들에 의존적이다.
- [0254] 예를 들어, 포유동물 또는 사람 환자와 같은 피험체 또는 환자의 치료를 위해, 투여량은 체중 및 피험체의 전반적인 건강, 치료되는 상태, 증상의 심각성 등과 같은 인자들을 기초로하여 결정된다. 투여량 및 농도는 어떤 바람직하지 않은 부작용을 피하면서 바람직한 이득을 생성하기 위해 결정된다. 피험체 화합물의 전형적인 투여량은 사람 환자에 대하여 약 0.5 내지 500 mg/일, 바람직하게는 약 1-100 mg/일의 범위 내이다. 예를 들어, 더 높은 투여량 요법은 예를 들어, 50-100, 75-100, 또는 50-75 mg/일을 포함하며, 더 낮은 투여량 요법은 예를 들어, 1-50, 25-50, 또는 1-25 mg/일을 포함한다. 특이적 구체예에서, 예를 들어, 본원에서 2(시클로아스트라제놀)로 칭해진 화합물이 적어도 1 mg/일, 바람직하게는 적어도 5 mg/일의 수준으로 투여되고; 또는 본원에서 1(아스트라갈로시드 IV)로서 칭해진 화합물은 적어도 50 mg/일, 바람직하게는 적어도 100 mg/일의 수준으로 투여된다.
- [0255] 본 발명의 지지하에서의 연구는 탁월한 생체이용가능성 및 낮은 독성을 갖는 화학식 I-III의 화합물을 지시한다. 예를 들어, 대표적인 화합물 시클로아스트라제놀(2)는 최대 5000 $\mu$ g/플레이트 수준에서, *Salmonella Typhimurium* 테스트 균주 TA98, TA100, TA1535, TA 1537 및 *E. coli* 테스트 균주 WP2 *uvrA*를 이용하는 Ames 테스트에서 장래의 역 박테리아 돌연변이에 대하여 음성이었다. 그것은 스프라거스-다울리(Sprague-Dawley) 래트에서 구조적으로 잘 용인되었으며, 그 후, 최대 100mg/kg의 단일 정맥 주사를 잘 용인하였다. 어떤 중요한 투여량-의존성 변화도 행동양식(섭식, 음료), 총중량, 조직 중량(심장, 폐, 간, 신장, 부신 및 비장), 혈액학 또는 임상 화학에 있어서 수컷 또는 암컷에 대하여 관찰되지 않았다.

### 도면의 간단한 설명

- [0256] 도 1A-H는 본원에서 설명되는 방법 및 조성물에 있어서 사용하기 위한 전형적인 화합물의 구조를 보여준다.
- 도 2는 TRAP 분석법에서 측정되는 바와 같이 2(시클로아스트라제놀)로 처리된 신생아의 케라티노사이트 내 텔로머라제 활성의 증가를 보여준다.
- 도 3은 TRAP 분석법에서 측정되는 바와 같이 EGF(10 nM) 및 용매 대조군과 비교하여, 1(아스트라갈로시드 IV)에 의한 신생아 케라티노사이트 내 텔로머라제 호라성의 증가를 보여준다.
- 도 4는 "스크래치 분석법"에서 측정되는 바와 같이 노화 성인 케라티노사이트 내 1(아스트라갈로시드 IV)의 상

치 치료 활성을 보이는 일련의 컴퓨터-발생 이미지이다.

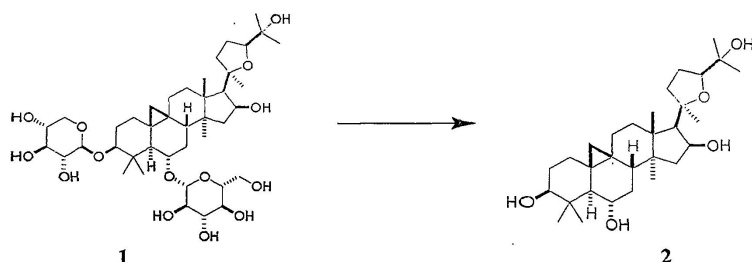
도 5는 젊은 신생아 케라티노사이트 내 1(아스트라갈로시드 IV) 및 2(시클로아스트라제놀)의 상처 치료 활성을 보이는 일련의 컴퓨터-발생 이미지이다.

도 6은 단독으로 및 텔로머라제 억제 올리고뉴클레오티드(GRN163) 또는 대조군 올리고뉴클레오티드(GRN137227)의 존재하에서, 노화 케라티노사이트 내 1(아스트라갈로시드 IV)의 상처 치료 활성을 보이는 일련의 컴퓨터-발생 이미지이다.

도 7은 텔로머라제 억제제 GRN163의 존재 및 부재하에서, 및 ~2 nM PDGF(혈소판 유도 성장 인자)와 비교하여 노화 신생아의 케라티노사이트 내 1(아스트라갈로시드 IV)의 상처 치료 활성을 보이는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

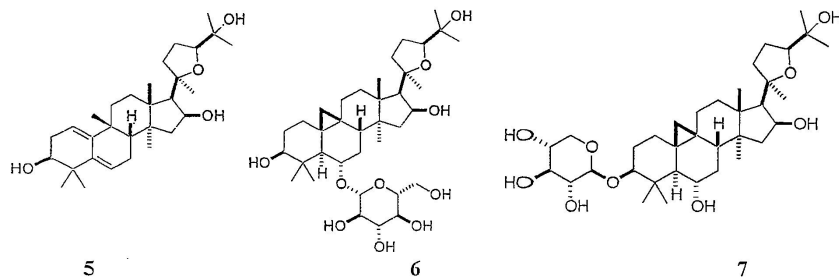
**실시예 1. 시클로아스트라제놀(2)로의 아스트라갈로시드 IV(1)의 전환**



아스트라갈로시드 IV (1) (5.00 g, mmol)에 "HCl-MeOH 10" (TCI 아메리카) (500 mL)을 첨가하고 혼합물을 7일 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 20℃에서(가열하지 않음) 감압하에 약 1/2의 양으로 농축시켰다. 혼합물을 수성 중탄산나트륨 및 에틸 아세테이트로 분할하였다. 수성 층을 에틸 아세테이트로 다시 추출하였다. 유기층을 혼합하고 포화 염화나트륨으로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 감압하에서 농축시켰다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다(20:1 ~ 14:1 클로로포름/메탄올). 잔여 용매를 에탄올로 대체하기 위해, 정제된 물질을 에탄올에 용해시키고 용매를 감압하에 제거시켜서 2(2.1 g, 64%)를 제공하였다.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (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). ESI-MS  $m/z$  양성 491 ( $M+H$ ), 음성 549 ( $M+AcO$ ). TLC (Merck, Kieselgel 60)  $R_f = 0.33$  (6:1 클로로포름/메탄올)

**실시예 2. 아스트라갈로시드 IV(1)로부터 화합물 5, 6 및 7의 제조: 수반하는 재배열과 함께 및 재배열하지 않고서, 아스트라갈로시드 IV(1)로부터 글리코시드의 제거**



메탄올 (80mL) 중 아스트라갈로시드 IV (1, 1.00 g, 1.28 mmol)의 용액에 황산(0.4 mL)을 첨가하고, 혼합물을 1.5시간 동안 환류시켰다. 실온에서 냉각한 후, 혼합물을 에틸 아세테이트 및 물에 부었다. 유기층을 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거하고, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(20:1~10:1~7:1 클로로포름/메탄올)에 의해 정제하여 재배열된 생성물 5 (24 mg, 4.0%), 모노글리코시드 6 (172 mg, 21%) 및 7 (29 mg, 3.6%) 및 아글리콘, 시클로아스트라제놀 (2) (326 mg, 52%)을 얻었다.



[0264] GRN140724: ESI-MS  $m/z$  623  $(M+H)^+$   $C_{35}H_{58}O_9 = 622$

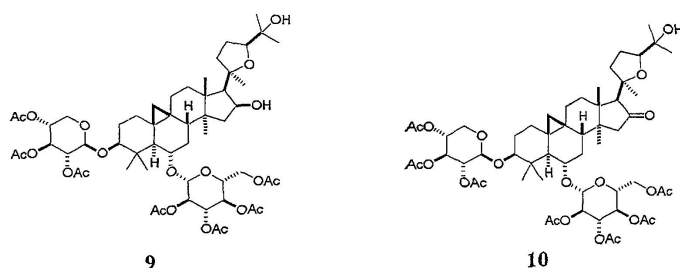
[0265] GRN140725: ESI-MS  $m/z$  653  $(M+H)^+$   $C_{36}H_{60}O_{10} = 652$

[0266] GRN140726: ESI-MS  $m/z$  473  $(M+H)^+$   $C_{30}H_{48}O_4 = 472$ .

[0267]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 0.72, 0.85, 0.95, 1.05, 1.11, 1.17, 1.18, 및 1.25 (s, 3H 각각), 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).

[0268] 실시예 3. 1의 아세틸화; 16-케톤 10의 형성:

[0269] 하기 화합물 9 및 10는 상기 인용되는 Kitagawa 1983b의 방법에 따라 얻었다. 요약하면, 아스트라갈로시드 IV (1)의 아세틸화는 유사한 양의 16-아세테이트 대응부와 함께 9를 제공하였다. 9의 피리디늄 클로로크로메이트 산화는 10을 제공하였다.



[0270]

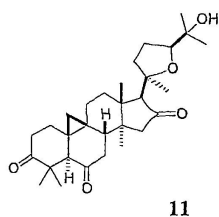
[0271] 실시예 4: 10의 탈아실화에 의한 4(도 1 참조)의 제조

[0272] 메탄올 중 상기 10의 용액(10 mg, 0.0093 mmol)에 수소화붕소 나트륨 (10 mg, 0.26 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반시켰다. 혼합물을 클로로포름 (3 mL)으로 희석시키고 직접 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (3:1 클로로포름/메탄올) 시켜서 4(8.0 mg, 정량)를 얻었다.

[0273] ESI-MS  $m/z$  783  $(M+H)^+$   $C_{41}H_{66}O_{14} = 782$ .

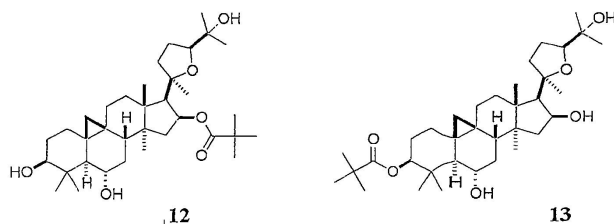
[0274] 실시예 5: 시클로아스트라제놀 2의 트리온 11의 형성

[0275] 시클로아스트라제놀의 3, 6, 16-트리온 유도체 11을 문헌[Kitagawa et al., Chem. Pharm. Bull. 31 (2): 689-697 (1983a)]의 방법에 따라서, 2의  $CrO_3$  산화에 의해 얻었다.



[0276]

[0277] 실시예 6. 시클로아스트라제놀(2)의 3- 또는 6- 히드록실 기의 아실화



[0278]

[0279] 디클로로메탄(5 mL) 중 시클로아스트라제놀 (2)(50 mg, 0.10 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.030 mL, 0.22 mmol) 및 피발로일 클로라이드(0.014 mL, 0.12 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 밤새 0°C에서 교반하였다. 혼합물을

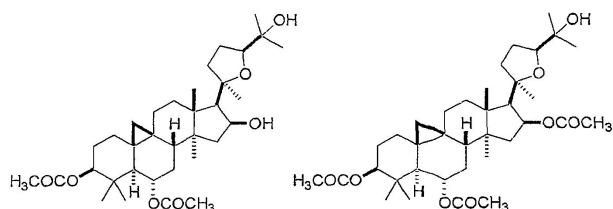
직접 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (1:1 ~ 1:2 헥산/에틸 아세테이트) 시켜서 **12** (17 mg, 30%) 및 **13** (3.3 mg, 2. 9%)을 얻었다.

[0280] **12**: ESI-MSm/z 575 (M+H)<sup>+</sup> C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub> = 574. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0281] **13**: ESI-MSm/z 575 (M+H)<sup>+</sup> C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub> = 574. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0282] 실시예 7A. 시클로아스트라제놀 (**2**)의 2차 히드록실의 아세틸화

[0283] 이 반응을 상기 인용되는 Kitagawa 1983a의 방법에 따라서 수행하였다. 요약하면, 아세트 무수물/피리딘을 이용한 아세틸화는 **14**(주 생성물) 및 **15**(부 생성물)의 혼합물을 제공하였다.

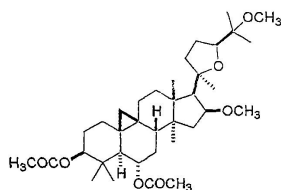


**14**

**15**

[0284]

[0285] 실시예 7B. 아세틸 기를 보유하는 3, 6-디아세틸 시클로아스트라제놀 (**14**)의 메틸화.



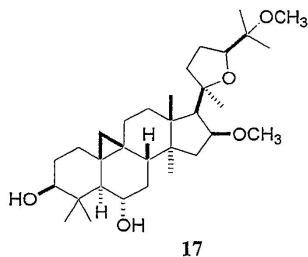
**16**

[0286]

[0287] 디메틸포름아미드 (3mL) 중 **14** (30 mg, 0.052 mmol)의 용액에 질소하에 0℃에서 이오도메탄(0.75mL, 12 mmol) 및 수소화 나트륨(60% 오일 분산, 40 mg, 1.0 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에서 제거시키고 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (4: 1 헥산/에틸 아세테이트)시켜서 화합물 **16** (29 mg, 92%)을 얻었다.

[0288] ESI-MS m/z 603(M+H)<sup>+</sup> C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>7</sub> = 602. <sup>1</sup>H BMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 0.33 (d, 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).

[0289] 실시예 7C. 16, 25-디메톡시 시클로아스트라제놀 17의 제조: 16으로부터 아세틸 기의 제거

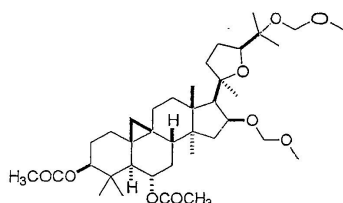


[0290]

[0291] 16 (28 mg, 0.046 mmol) 및 소듐 메톡사이드(0.5 mol/L in 메탄올, 6mL)의 혼합물을 48시간 동안 실온에서 교반하였다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거시키고, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (2: 3 헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 디메톡시 디올 화합물 17 (23 mg, 96%)을 얻었다.

[0292] ESI-MS  $m/z$  519(M+H)<sup>+</sup> C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>O<sub>5</sub> = 518. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0293] 실시예 7D. 아세틸 기를 보유하는 3, 6-디아세틸 시클로아스트라제놀 (14)의 알킬화

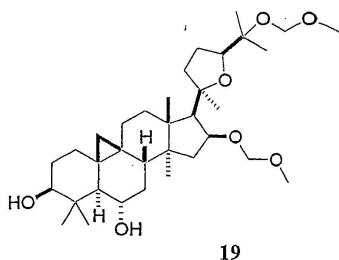


[0294]

[0295] 디클로로메탄(10mL) 중 14 (109 mg, 0.190 mmol)의 용액에 디이소프로필에틸아민(1.0 mL) 및 클로로메틸 메틸 에테르 (0.5 mL)를 첨가하고, 혼합물을 24 시간 동안 실온에서 교반하였다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거시키고, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (3:1 헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 화합물 18 (114 mg, 90%)을 얻었다.

[0296] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0297] 실시예 7E. 18로부터 아세틸 기의 제거



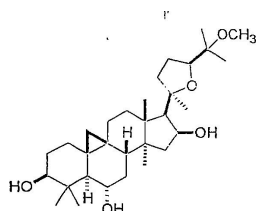
[0298]

[0299] 18, 상기 (시클로아스트라제놀의 3,6-디아세틸-16, 25-디(메톡시메틸) 에테르 유도체)(102 mg, 0.150 mmol) 및 소듐 메톡사이드 (메탄올 중 0.5 mol/L, 10mL)의 혼합물을 48시간 동안 실온에서 교반하였다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서

건조시켰다. 용매를 감압하에 제거시키고 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (1: 1 헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 디(메톡시메틸)에테르 화합물 **19** (80 mg, 92%)를 얻었다.

[0300] ESI-MS  $m/z$  579 (M+H)<sup>+</sup> + C<sub>34</sub>H<sub>58</sub>O<sub>7</sub> = 578. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0301] 실시예 8. 트리아세틸 시클로아스트라제놀 **15**의 알킬화 후, 아세틸 기의 제거



**20**

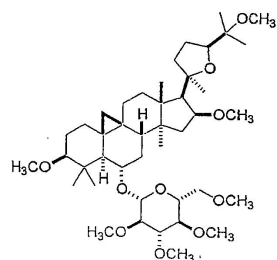
[0302]

[0303] 디메틸포름아미드 (3mL) 중 **15** (30 mg, 0.049 mmol)의 용액에 질소하에 0℃에서 이오도메탄 (0.75mL, 12 mmol) 및 수소화 나트륨 (60% 오일 분산, 40mg, 1.0 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에서 제거하였다.

[0304] 잔여물에 메탄올 중 소듐 메톡사이드 (0.5 mol/L, 6 mL)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 10% 염산을 첨가하고 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거하고, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (1: 2 헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 **20** (23 mg, 93%)을 얻었다.

[0305] ESI-MS  $m/z$  505 (M+H)<sup>+</sup> C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O<sub>5</sub> = 504. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.33 (d, J= 4.3 Hz, 1H), 0.48 (d, J= 4.3 Hz, 1H), 0.8-2.1 (m, 17H), 0.91 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 2.28 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 2.60 (q, J= 10.9 Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 3.27 (m, 1H), 3.51 (td, J= 9.8, 3.5 Hz, 1H), 3.72 (dd, J= 9.0, 5.5 Hz, 1H), 4.62 (m, 1H).

[0306] 실시예 9A. 시클로아스트라제놀 모노글리코시드 **6**의 유리 히드록실의 알킬화



**21**

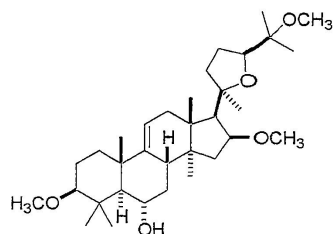
[0307]

[0308] 디메틸포름아미드 (4mL) 중 **6** (50 mg, 0.077 mmol)의 용액에 질소하에 0℃에서 이오도메탄 (1.0 mL, 16 mmol) 및 수소화 나트륨 (60% 오일 분산, 60 mg, 1.5 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거시키고, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (3:1 헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 퍼메톡시 화합물 **21** (33 mg, 57%)을 얻었다.

[0309] ESI-MS  $m/z$  751 (M+H)<sup>+</sup> C<sub>43</sub>H<sub>74</sub>O<sub>10</sub> = 750. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0310] 실시예 9B. 3, 16, 25-트리메톡시 아스트라제놀, 22의 제조: 수반하는 재배열과 함께 퍼메톡시 화합물 21로부터 글리코시드의 제거



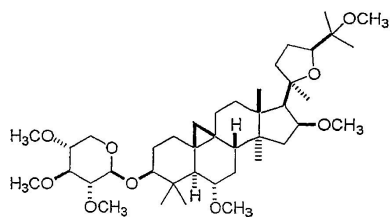
22

[0311]

[0312] 메탄올 (10 mL) 중 21 (30 mg, 0.040 mmol)의 용액에 황산(0.2 mL)을 첨가하고, 혼합물을 10시간 동안 환류시켰다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거시키고, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (4: 1 헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 22(3.6 mg, 17%)를 얻었다.

[0313] ESI-MS  $m/z$  533(M+H)<sup>+</sup> C<sub>33</sub>H<sub>56</sub>O<sub>5</sub> = 532. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0314] 실시예 10A. 시클로아스트라제놀 모노글리코시드 7의 유리 히드록실의 알킬화



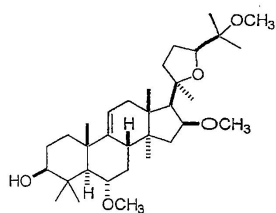
23

[0315]

[0316] 화합물 23 (18 mg, 53%)을 상기 화합물 21의 제조를 위해 사용된 과정에 따라 7(30 mg)로부터 얻었다.

[0317] ESI-MS  $m/z$  707 (M+H)<sup>+</sup> C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>O<sub>9</sub> = 706. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0318] 실시예 10B. 6,16,25-트리메톡시 아스트라제놀, 24의 제조: 수반하는 재배열과 함께 퍼메톡시 화합물 23로부터 글리코시드의 제거



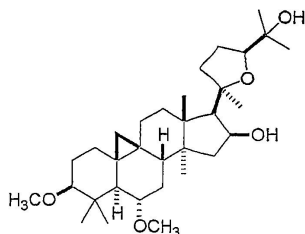
24

[0319]

[0320] 화합물 **24** (7.1 mg, 56%)를 상기 화합물 **22**의 제조를 위해 사용된 과정에 따라 **23** (17 mg)으로부터 얻었다.

[0321] ESI-MS  $m/z$  533 (M+H)<sup>+</sup> C<sub>33</sub>H<sub>56</sub>O<sub>5</sub> = 532. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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= 5.5Hz, 1H).

[0322] 실시예 11. 3,6-디메톡시 시클로아스트라제놀 **25**의 제조: 디(메톡시메틸)에테르 기의 제거와 함께 16,25-디(메톡시메틸)에테르 화합물 **19**의 메틸화



[0323] **25**

[0324] 디메틸포름아미드 (3 mL) 중 **19** (30 mg, 0.052 mmol)의 용액에 질소하에 0℃에서 이오도메탄 (0.75mL, 12 mmol) 및 수소화 나트륨 (60% 오일 분산, 40 mg, 1.0 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거하였다.

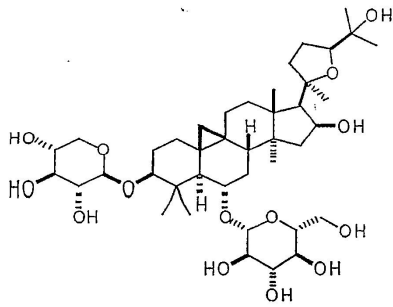
[0325] 이 잔여물에 테트라히드로푸란(5 mL) 및 10% 염산(1 mL)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 1시간 동안 환류시켰다. 물을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고 무수 황산 나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거하고, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (3:1 ~ 1:1 헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 **25** (13 mg, 48%) 및 소량(7.4 mg, 25%)의 3, 6-디메톡시-16-(메톡시메틸)에테르 화합물 **26**을 얻었다.

[0326] **25**: ESI-MS  $m/z$  563(M+H)<sup>+</sup> C<sub>34</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub> = 562. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

[0327] **26**: ESI-MS  $m/z$  519 (M+H)<sup>+</sup> C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>O<sub>5</sub> = 518. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

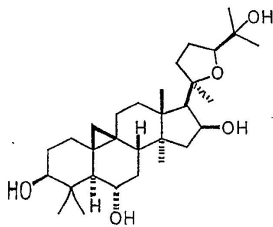
도면

도면1a



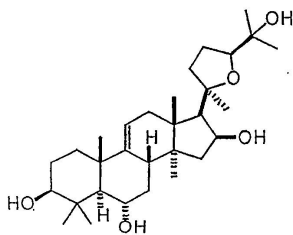
1 ( 아스트랄로시드 IV)

도면1b



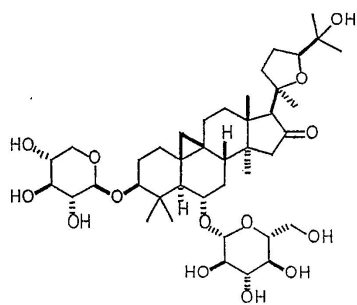
2 ( 시클로아스트라제놀 )

도면1c



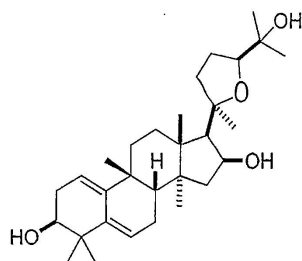
3 ( 아스트라제놀.)

도면1d



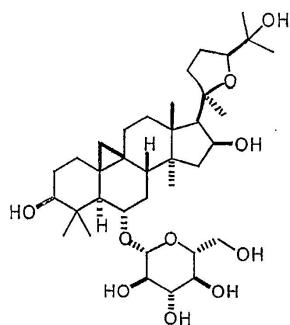
4 (아스트랄칼로시드 IV 16- 은 )

도면1e



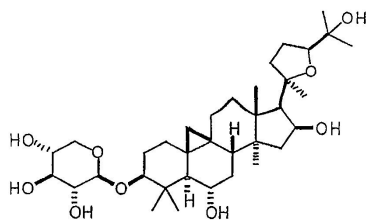
5

도면1f



6

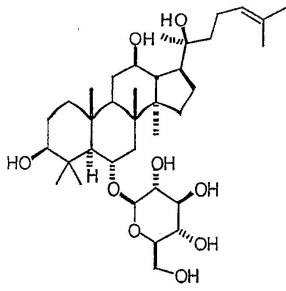
도면1g



7

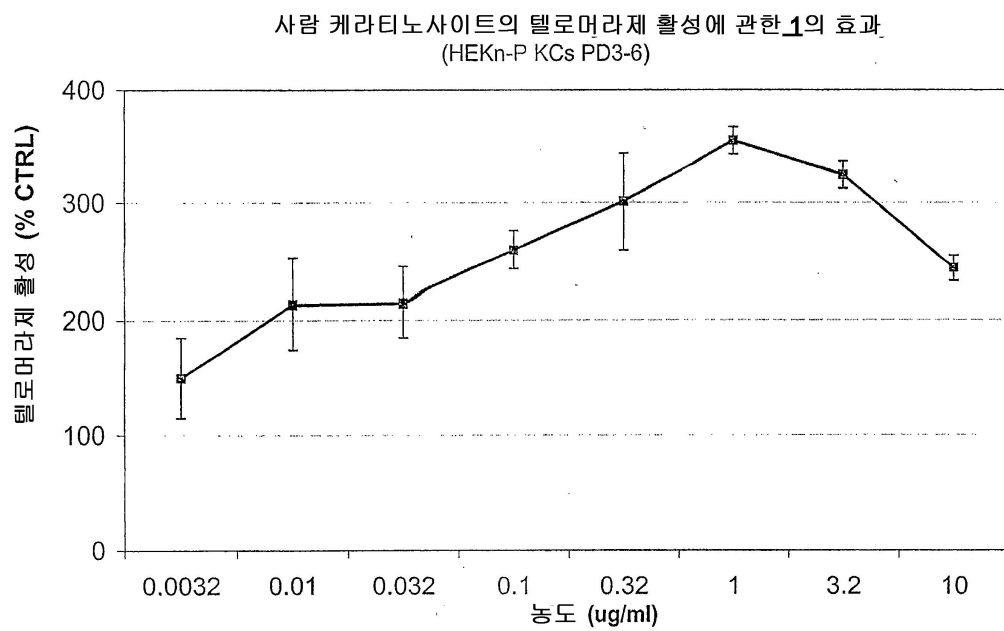


도면1h

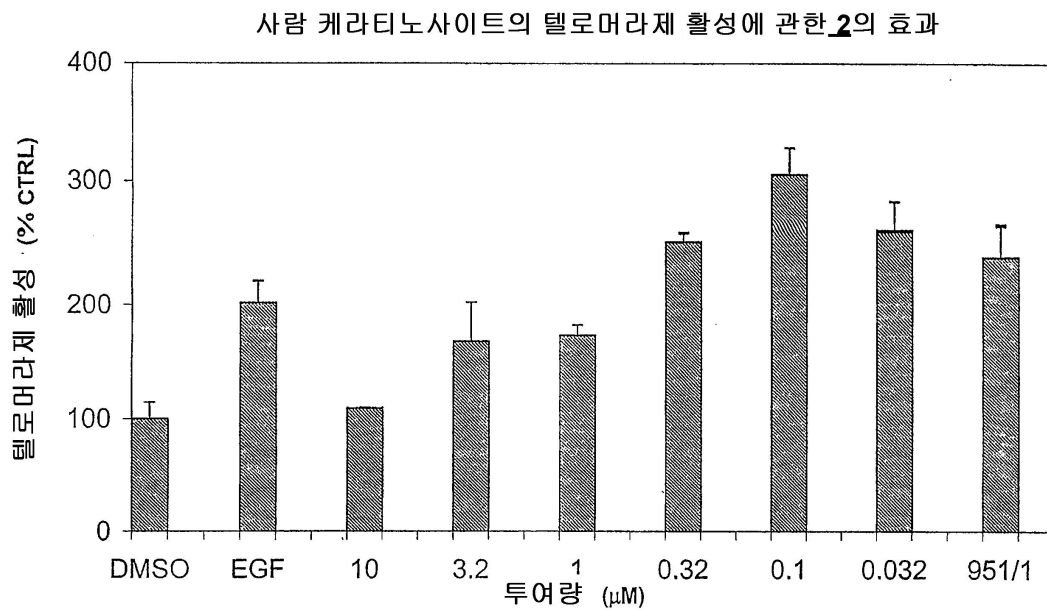


8 (진세노시드 RH1)

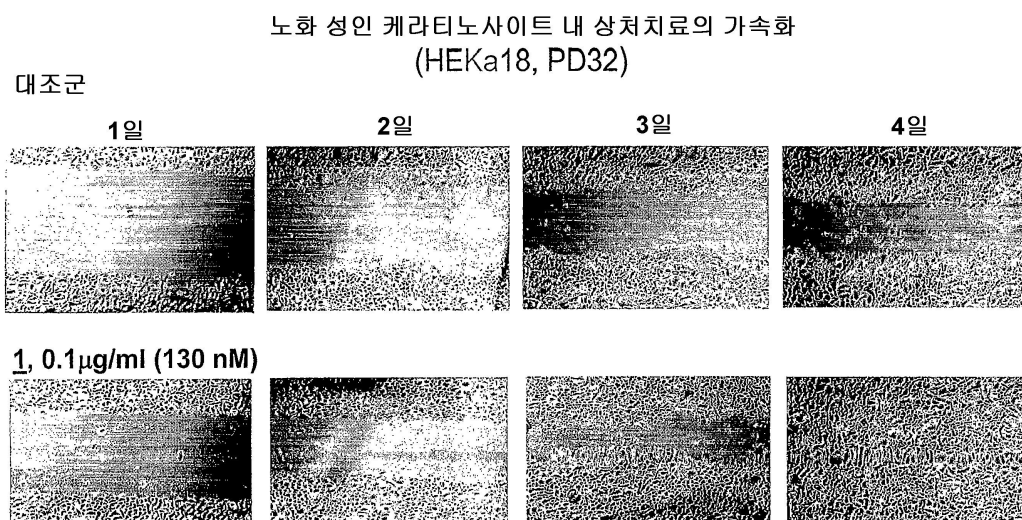
도면2



도면3



도면4



## 도면5

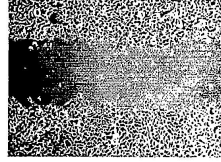
### 젊은 케라티노사이트 내 상처 치료의 가속화 (HEKn-P, PD14)

대조군

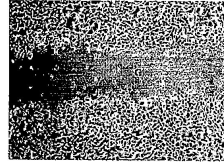
1일



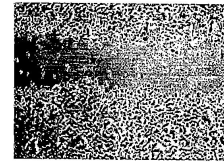
2일



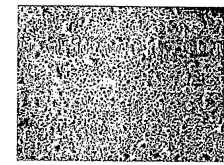
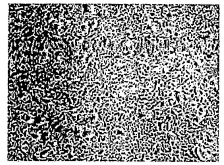
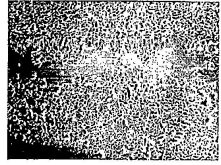
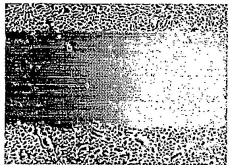
3일



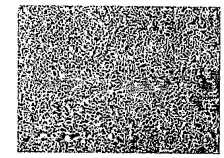
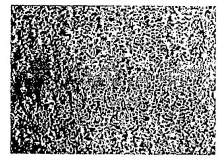
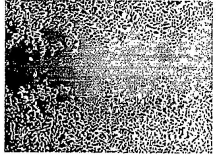
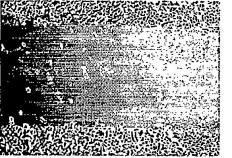
4일



1, 12.7 nM



2, 10 nM

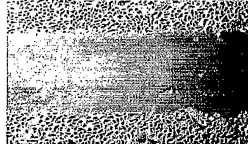


## 도면6

### 노화 케라티노사이트 내 상처 치료의 가속화

1, 1 $\mu$ g/ml (1.3  $\mu$ M)

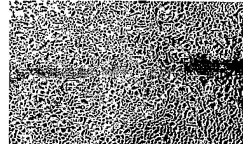
1일



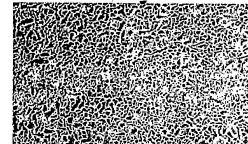
2일



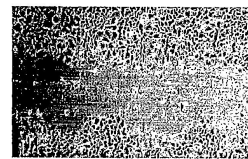
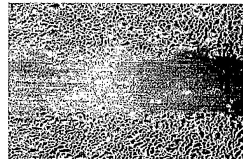
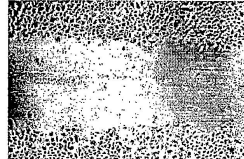
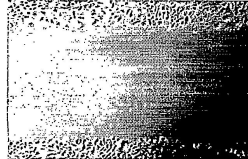
3일



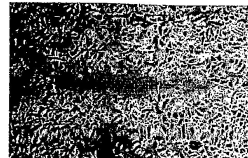
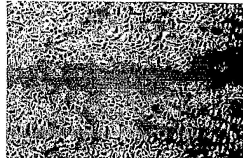
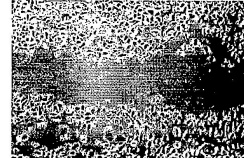
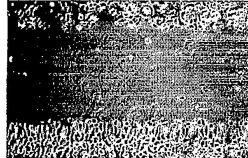
4일



1 (1.3  $\mu$ M) + GRN163 (10 $\mu$ M)



1 (1.3  $\mu$ M) + GRN137227 (10 $\mu$ M)



도면7

