

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4070966号
(P4070966)

(45) 発行日 平成20年4月2日 (2008.4.2)

(24) 登録日 平成20年1月25日 (2008.1.25)

(51) Int.Cl.			F 1		
C O 7 H	15/04	(2006.01)	C O 7 H	15/04	E
C O 7 H	15/14	(2006.01)	C O 7 H	15/04	F
A 6 1 K	8/60	(2006.01)	C O 7 H	15/14	
A 6 1 K	8/02	(2006.01)	A 6 1 K	8/60	
A 6 1 K	8/00	(2006.01)	A 6 1 K	8/02	

請求項の数 7 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-196016 (P2001-196016)	(73) 特許権者	504180206
(22) 出願日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		株式会社カネボウ化粧品
(65) 公開番号	特開2003-12684 (P2003-12684A)		東京都港区虎ノ門五丁目11番2号
(43) 公開日	平成15年1月15日 (2003.1.15)	(72) 発明者	植松 季栄
審査請求日	平成15年3月5日 (2003.3.5)		北海道札幌市北区北10条西8丁目北海道
(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願 (平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発機構グリコクラスター制御生体分子合成技術委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)		(72) 発明者	中島 史雄
			北海道札幌市北区北10条西8丁目北海道
		(72) 発明者	吉田 雅宏
			北海道札幌市北区北10条西8丁目北海道
		(72) 発明者	福永 恭子
			北海道札幌市北区北10条西8丁目北海道
			大学大学院 理学研究科西村研究室内
			最終頁に続く

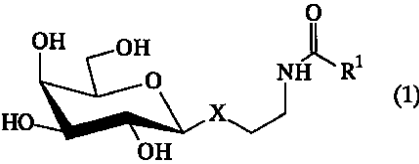
(54) 【発明の名称】 新規ガラクトシルセラミド類縁体及び用途

(57) 【特許請求の範囲】

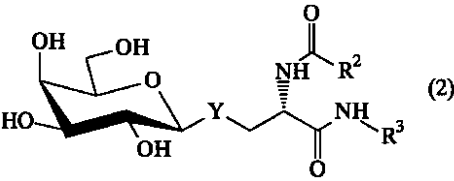
【請求項1】

下記一般式(1)又は(2)で示されるガラクトシルセラミド類縁体。

【化1】



【化2】

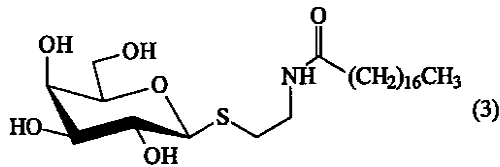


(但し、XはS、YはOであり、R¹、R²は炭素数9～35のアルキル基又はアルケニル基である。R³は、炭素数2～30のアルキル基又はアルケニル基である。)

【請求項2】

下記構造式(3)で表されるガラクトシルセラミド類縁体。

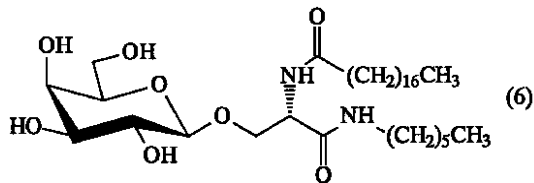
【化 3】



【請求項 3】

下記構造式 (6) で表されるガラクトシルセラミド類縁体。

【化 4】

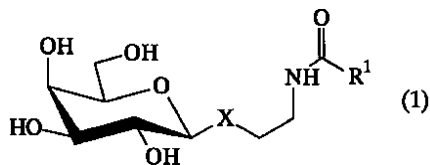


10

【請求項 4】

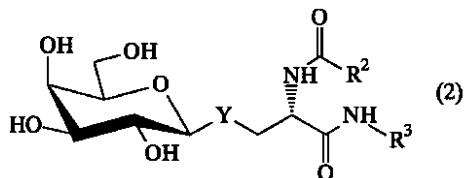
下記一般式 (1) 又は (2) で示されるガラクトシルセラミド類縁体を含有することを特徴とする皮膚外用剤。

【化 5】



20

【化 6】



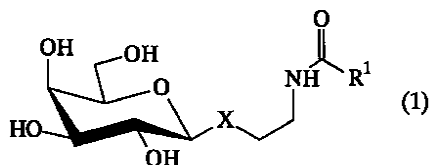
(但し、X、Y は、S 又は O であり、 R^1 、 R^2 は炭素数 9 ~ 35 のアルキル基又はアルケニル基である。 R^3 は、炭素数 2 ~ 30 のアルキル基又はアルケニル基である。)

30

【請求項 5】

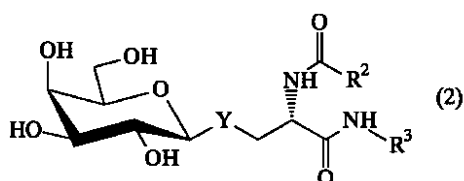
下記一般式 (1) 又は (2) で示されるガラクトシルセラミド類縁体を有効成分とする - グルコセレブロシダーゼ活性化剤。

【化 7】



40

【化 8】



(但し、X、Y は、S 又は O であり、 R^1 、 R^2 は炭素数 9 ~ 35 のアルキル基又はアルケニル基である。 R^3 は、炭素数 2 ~ 30 のアルキル基又はアルケニル基である。)

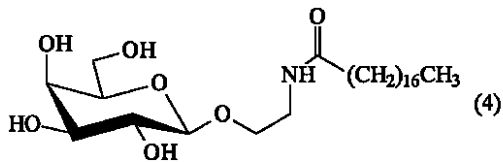
【請求項 6】

下記構造式 (4) で表されるガラクトシルセラミド類縁体 を含有することを特徴とする

50

皮膚外用剤。

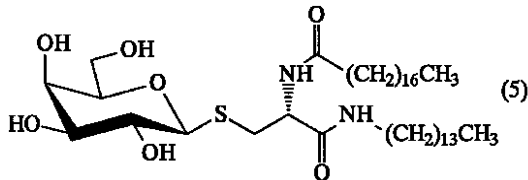
【化 9】



【請求項 7】

下記構造式 (5) で表されるガラクトシルセラミド類縁体を含むことを特徴とする皮膚外用剤。

【化 10】



【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ガラクトシルセラミド類縁体、皮膚外用剤及び - グルコセレブロシダーゼ活性化剤に関する。さらに詳しくは、特定のガラクトシルセラミド類縁体によって表皮中の - グルコセレブロシダーゼを活性化する - グルコセレブロシダーゼ活性化剤及び皮膚外用剤に関し、これらは、荒れ肌および各種皮膚疾患の改善が期待される。

【0002】

【従来の技術】

荒れ肌とは、一般に角質細胞の剥離現象が認められる乾燥状態の皮膚をいう。このような荒れ肌はコレステロール、セラミド、脂肪酸等の角質細胞間脂質の溶出、および紫外線、洗剤等に起因する角質細胞の変性や表皮細胞の増殖・角化バランスの崩壊による角層透過バリアの形成不全等によって発生する。この荒れ肌を予防または治癒する目的で、角質細胞間脂質成分又はそれに類似する合成の角質細胞間脂質を供給したり、上皮増殖因子 (EGF; Epidermal Growth Factor) 等の表皮細胞増殖・角化調節物質などを投与するなどの研究が行われている。

【0003】

この角層細胞間脂質は、有棘層と顆粒層の細胞で生合成された層板顆粒が、角層直下で細胞間に放出され、伸展し、層板 (ラメラ) 構造をとり、細胞間に広がったものである。層板顆粒はグルコシルセラミド、コレステロール、セラミド、リン脂質等から構成されるが、角層細胞間脂質にはグルコシルセラミドは殆ど含まれていない。すなわち、層板顆粒中のグルコシルセラミドは、 - グルコセレブロシダーゼによって加水分解を受け、セラミドに変換され、このセラミドがラメラ構造をとる結果、角層細胞間脂質として角層透過バリアの形成を改善し、荒れ肌防御のバリアの働きを持つと考えられる。たとえば、 - グルコセレブロシダーゼを遺伝的に完全に欠損したゴーシェ病タイプ2の疾患患者では病的荒れ肌が観察され、また、その表皮の組織学的研究によって角層細胞間脂質のラメラ構造に異常が認められている。また、 - グルコセレブロシダーゼを人為的に欠損させたトランスジェニックマウスでも角層細胞間脂質のラメラ構造の異常と荒れ肌の相関が認められている。さらに実験的にも、 - グルコセレブロシダーゼを阻害した場合に荒れ肌と角層細胞間脂質のラメラ構造の異常が観察されている。これらの諸事実より正常な角層透過バリアの形成にはグルコシルセラミドが - グルコセレブロシダーゼによってセラミドに加水分解されることが必要であるといわれている。従って、 - グルコセレブロシダーゼを活性化させることによって、角層透過バリアの形成が改善され、その結果として荒れ肌を

10

20

30

40

50

改善することが可能であると考えられる。

【 0 0 0 4 】

このような背景にあって、 α -グルコセレブロシダーゼの活性化因子として、従来、モルモット脾臓から発見された S A P - 2 やヒトゴーシェ病脾臓から発見された A 1 a やサポシン C が知られている。

【 0 0 0 5 】

しかし、これら活性化因子はタンパク質であってこれらを外用して表皮の α -グルコセレブロシダーゼを活性化させることは経皮吸収性や安全性の点で大きな問題がある。また、これらのタンパク質を単離して産業上利用することはコスト面より極めて困難である。

【 0 0 0 6 】

一方、タンパク質以外の α -グルコセレブロシダーゼ活性化因子としては、 α -ガラクトシルセラミドが知られている。

【 0 0 0 7 】

しかし、現実的に利用可能な α -ガラクトシルセラミドは、牛脳抽出物由来であり、これを外用に用いることは、安全性の点で大きな問題がある。また、 α -ガラクトシルセラミドの大量合成は極めて難しく高コストであることが、産業上利用する上での欠点となっていた。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的とするところは、 α -グルコセレブロシダーゼを活性化させることによって、角層透過バリアの形成が改善され、その結果として荒れ肌改善効果が期待される、容易に入手可能な α -グルコセレブロシダーゼ活性化剤及び皮膚外用剤を提供するにある。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

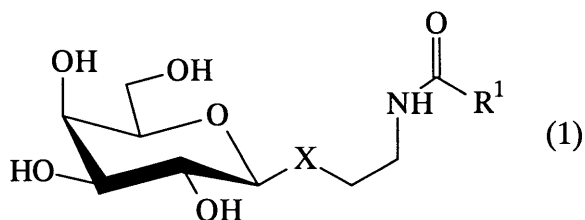
そこで本発明者らは、上記の事情に鑑み、従来の問題を解決する方法を鋭意研究した結果、後記特定の化合物によって意外にも表皮中の α -グルコセレブロシダーゼを極めて容易に、強く活性化できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、下記一般式 (1) 又は (2) で示されるガラクトシルセラミド類縁体、該ガラクトシルセラミド類縁体を含有することを特徴とする皮膚外用剤、該ガラクトシルセラミド類縁体を有効成分とする α -グルコセレブロシダーゼ活性化剤にある。

【 0 0 1 1 】

【化 7 】



【 0 0 1 2 】

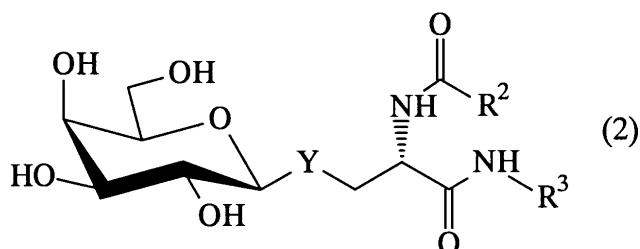
【化 8 】

10

20

30

40



【 0 0 1 3 】

(但し、X、Yは、S又はOであり、R¹、R²は炭素数9～35のアルキル基又はアルケニル基である。R³は、炭素数2～30のアルキル基又はアルケニル基である。)

10

【 0 0 1 4 】

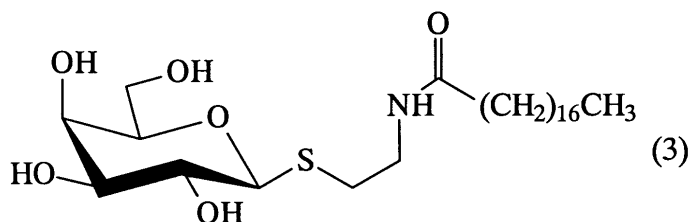
【発明の実施の形態】

本発明で用いられるガラクトシルセラミド類縁体は、前記一般式(1)又は(2)で表わされる。R¹及びR²は、炭素数9～35であり、好ましくは14～24であり、飽和であっても、不飽和であっても良い。具体的には、例えば、下記の化学式で表わされるものを挙げることができる。

【 0 0 1 5 】

【化9】

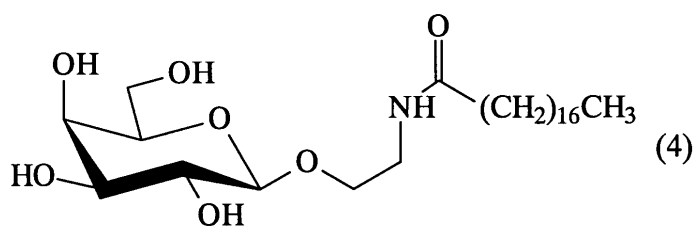
20



【 0 0 1 6 】

【化10】

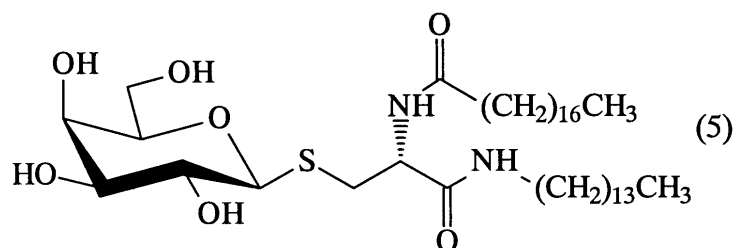
30



【 0 0 1 7 】

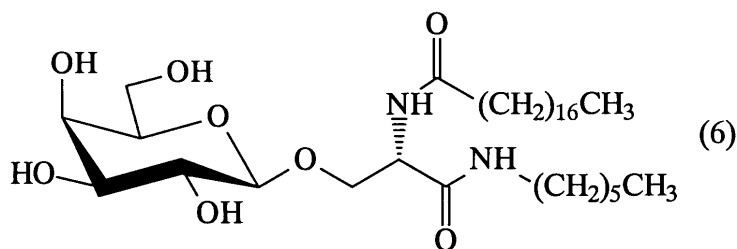
【化11】

40



【 0 0 1 8 】

【化12】



【 0 0 1 9 】

これらの化合物は、公知のアミド合成方法で容易に製造することができる。例えば、合成方法の概略を示すとすれば、二本のアルキル鎖を有する一般式（２）で示される化合物は、アミン、カルボン酸部分を保護したセリン又はシステインに、グルコシル化反応によりガラクトースを導入した後、アミノ基部分の脱保護及び縮合反応により一つのアルキル基を導入し、続いてカルボン酸の保護基を除去し、三塩化リンを作用させ酸クロライドとした後、第一アミンと反応させ製造することができる。また、一本鎖の化合物を有する一般式（１）で示される化合物も同様に製造することができる。

10

【 0 0 2 0 】

本発明に係る - グルコセレブロシダーゼ活性化剤、皮膚外用剤は、軟膏、ローション、乳液、ミルク、パップ剤、パック、ミスト、フォーム、顆粒、粉末、ゲル等種々の剤形とすることができる。なお、本発明において、皮膚外用剤とは、頭皮を含む身体のすべての皮膚を対象とするものであり、入浴剤を包含するものである。基材は一般に用いられる外用基剤ならば特に制限されない。また、最終形態は、化粧品、医薬品、医薬部外品とすることができる。

20

【 0 0 2 1 】

ガラクトシルセラミド類縁体の - グルコセレブロシダーゼ活性化剤、皮膚外用剤への配合量は、組成物総量を基準として、全組成量の 0 . 0 0 5 ~ 5 . 0 質量%が好ましく、0 . 0 1 ~ 3 . 0 質量%が更に好ましい。0 . 0 0 5 質量%未満の配合量では本発明の目的とする効果が充分でない場合があり、一方、5 . 0 質量%を超えてもその増加分に見合った効果の向上はない場合がある。

【 0 0 2 2 】

30

【実施例】

以下、実施例により詳細に説明する。なお、本発明は以下の実施例に何ら限定されるものではない。

【 0 0 2 3 】

実施例 1

N - [2 - - D - ガラクトピラノシルチオ - 1 - (テトラデシルカルバモイル) エチル] オクタデカノイルアミド [一般式 (5) の化合物] の製造 :

(1) 1 , 2 , 3 , 4 , 6 - ペンタ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシド 3 0 0 m g と 2 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 3 - メルカプトプロピオン酸メチル 4 3 0 m g をクロロホルム 4 m L に溶かし、0 まで冷却した後、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 1 . 3 m L を加え室温で 2 0 時間攪拌した。反応混合液にクロロホルムを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した。残渣を分取薄層クロマトグラフィー (展開溶媒 ; n - ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2) で精製することによって、2 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシルチオ) プロピオン酸メチルを 3 7 0 m g 得た。

40

【 0 0 2 4 】

(2) 2 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシルチオ) プロピオン酸メチル 3 7 0 m g を 1 , 4 - ジオキサン 5 m L とメタノール 5 m L の混合溶媒に溶かし、2 0 % 水酸化パラジウムカーボン 2 0 0 m g を加え、水素気流下で 1 8 時間攪拌した。セライトを用いて不溶物を濾別

50

した後、濾液を減圧濃縮した。残渣をDMF 6 mLに溶かし、ステアリン酸 193 mg、EDC [; 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド] 180 mg、HOBt (; 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール) 140 mgを加え、室温で一晩攪拌した。反応混合液を酢酸エチルで抽出し、2 mol / L 塩酸と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、次いで減圧下で溶媒を留去した。最後に得られた残渣を中圧カラムクロマトグラフィ - (溶出溶媒 ; n - ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1) で精製することによって、2 - (オクタデカノイルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシルチオ) プロピオン酸メチルを 313 mg 得た。

【 0 0 2 5 】

10

(3) 2 - (オクタデカノイルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシルチオ) プロピオン酸メチル 313 mg をピリジン 6 mL に溶かし、ヨウ化リチウム 515 mg を加えた後、窒素雰囲気下、4 時間加熱還流した。反応混合液を酢酸エチルで抽出し、2 mol / L 塩酸で洗浄後、酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、次いで減圧下で溶媒を留去した。最後に得られた残渣を中圧カラムクロマトグラフィ - (溶出溶媒 ; クロロホルム : メタノール = 15 : 1) で精製することによって、2 - (オクタデカノイルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシルチオ) プロピオン酸を 247 mg 得た。

【 0 0 2 6 】

20

(4) 2 - (オクタデカノイルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシルチオ) プロピオン酸 247 mg を DMF 4 mL に溶かし、n - テトラデシルアミン 80 mg、EDC 100 mg、HOBt 80 mg を加え、室温にて 17 時間攪拌した。反応混合液を酢酸エチルで抽出し、2 mol / L 塩酸と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、次いで減圧下で溶媒を留去した。最後に得られた残渣を中圧カラムクロマトグラフィ - (溶出溶媒 ; n - ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) で精製することによって、N - [1 - (テトラデシルカルバモイル) - 2 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - - D - ガラクトピラノシルチオ) エチル] オクタデカノイルアミドを 278 mg 得た。

【 0 0 2 7 】

30

(5) N - [1 - (テトラデシルカルバモイル) - 2 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - - D - ガラクトピラノシルチオ) エチル] オクタデカノイルアミド 278 mg を THF 5 mL とメタノール 5 mL の混合溶媒に溶かし、28 % ナトリウムメチラートメタノール溶液を触媒量加え、室温で 1 時間攪拌した。反応混合液を陽イオン交換樹脂 (ダウエクセス 50 W - X 8) を用いて中和した後、樹脂を濾別し、濾液を減圧濃縮した。最後に得られた残渣をメタノールで結晶化することによって、N - [2 - (- D - ガラクトピラノシルチオ) - 1 - (テトラデシルカルバモイル) エチル] オクタデカノイルアミドを白色の結晶として 202 mg 得た。

【 0 0 2 8 】

NMR (DMSO - d₆) : 0 . 8 6 (t , 3 H , J = 5 . 9 H z) , 1 . 2 4 (s , 4 6 H) , 1 . 3 5 - 1 . 5 5 (m , 4 H) , 2 . 1 5 - 2 . 5 0 (m , 2 H) , 3 . 7 1 (b s , 1 H) , 4 . 2 4 (d t , 1 H) , 7 . 7 1 (b t , 1 H) , 7 . 9 2 (d , 1 H , J = 7 . 9 H z) .

40

TOF - MS : m / z 768 (M + Na)⁺ , 784 (M + K)⁺ .

元素分析値 (C₄₁H₈₀N₂O₇S · 1 / 10 H₂O として)

計算値 (%) C , 65 . 93 ; H , 10 . 82 ; N , 3 . 75 ; S , 4 . 29

実測値 (%) C , 65 . 67 ; H , 10 . 82 ; N , 3 . 68 ; S , 4 . 29 .

【 0 0 2 9 】

実施例 2

N - [2 - (- D - ガラクトピラノシルオキシ) エチル] オクタデカノイルアミド [一般式 (4) の化合物] の製造 :

50

(1) 1, 2, 3, 4, 6 - ペンタ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシド 1.8 g と 2 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ)エタノール 1.2 g を 1, 2 - ジクロロエタン 10 mL に溶かし、0 まで冷却した後、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 3.6 mL を加え室温で 17 時間攪拌した。反応混合液にクロロホルムを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; n - ヘキサン: 酢酸エチル = 3 : 1) で精製することによって、2 - (2, 3, 4, 6 - O - テトラ - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルオキシ)エチルカルバミン酸ベンジルを 1.3 g 得た。

【0030】

(2) 2 - (2, 3, 4, 6 - O - テトラ - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルオキシ)エチルカルバミン酸ベンジル 250 mg を 1, 4 - ジオキサン 3 mL とメタノール 3 mL の混合溶媒に 20 % 水酸化パラジウムカーボン 170 mg を加え、水素気流下で 18 時間攪拌した。セライトを用いて不溶物を濾別した後、濾液を減圧濃縮した。残渣を DMF 5 mL に溶かし、ステアリン酸 123 mg、EDC 90 mg、HOBt 75 mg を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合液を酢酸エチルで抽出し、2 mol/L 塩酸と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、次いで減圧下で溶媒を留去した。最後に得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; n - ヘキサン: 酢酸エチル = 1 : 1) で精製することによって、N - [2 - (2, 3, 4, 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルオキシ)エチル]オクタデカノイルアミドを 103 mg 得た。

【0031】

(3) N - [2 - (2, 3, 4, 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルオキシ)エチル]オクタデカノイルアミド 103 mg を 1, 4 - ジオキサン 2 mL とメタノール 2 mL の混合溶媒に溶かし、28 % ナトリウムメチラートメタノール溶液を触媒量加え、室温で 4 時間攪拌した。反応混合液を陽イオン交換樹脂 (ダウエックス 50W - X8) を用いて中和した後、樹脂を濾別し、濾液を減圧濃縮した。最後に得られた残渣をメタノールで結晶化することによって、N - [2 - (- D - ガラクトピラノシルオキシ)エチル]オクタデカノイルアミドを白色の結晶として 59 mg 得た。

【0032】

NMR (DMSO - d₆) : 0.84 (t, 3H, J = 6.4 Hz), 1.26 (s, 28H), 1.45 - 1.50 (m, 2H), 2.04 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 3.40 - 3.50 (m, 3H), 3.61 (bs, 1H), 3.68 (dt, 1H, J = 5.8, 10.2 Hz), 4.05 (d, 1H, J = 6.7 Hz), 4.32, 4.56, 4.67, 4.81 (4bs, 4H), 7.72 (t, 1H, J = 5.6 Hz).
TOF - MS: m/z 512 (M + Na)⁺, 528 (M + K)⁺.

元素分析値 (C₂₆H₅₁NO₇ · 1/5 H₂O として):

計算値 (%) C, 63.31; H, 10.50; N, 2.84

実測値 (%) C, 63.14; H, 10.22; N, 2.86.

【0033】

実施例 3

N - [2 - (- D - ガラクトピラノシルチオ)エチル]オクタデカノイルアミド [一般式 (3) の化合物] の製造:

(1) 2 - (2, 3, 4, 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルチオ)エチルカルバミン酸ベンジル 1.0 g をメタノール 10 mL と 1, 4 - ジオキサン 10 mL の混合溶媒に溶かし、水酸化パラジウム 1 g を加え、水素気流下で 6 時間攪拌した。セライトにて不溶物を濾別した後、濾液を減圧濃縮した。残渣を DMF 10 mL に溶かし、ステアリン酸 432 mg、EDC 364 mg、HOBt 257 mg を加え、室温にて一晩攪拌した。反応混合液をクロロホルムで希釈し、2 mol/L 塩酸と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、クロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、次いで減圧下で溶媒を留去した。最後に得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶

10

20

30

40

50

出溶媒；n - ヘキサン：酢酸エチル = 3 : 1) で精製することによって、N - [2 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルチオ) エチル] オクタデカノイルアミドを 4 4 2 m g 得た。

【 0 0 3 4 】

(2) N - [2 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルチオ) エチル] オクタデカノイルアミド 4 4 0 m g を 1 , 4 - ジオキサン 1 0 m L とメタノール 1 5 m L の混合溶媒に溶かし、2 8 % ナトリウムメチラートメタノール溶液を触媒量加え、室温で 2 時間攪拌した。反応混合液を陽イオン交換樹脂 (ダウエックス 5 0 W - X 8) を用いて中和した後、樹脂を濾別し、濾液を減圧濃縮した。最後に得られた残渣をメタノールで結晶化することによって、N - [2 - (- D - ガラクトピラノシルチオ) エチル] オクタデカノイルアミドを白色の結晶として 2 0 9 m g 得た。

10

【 0 0 3 5 】

NMR (DMSO - d₆) : 0 . 8 5 (t , 3 H , J = 6 . 6 H z) , 1 . 2 6 (s , 3 0 H) , 1 . 4 5 - 1 . 5 0 (m , 2 H) , 2 . 0 0 - 2 . 1 0 (t , 2 H , J = 7 . 2 H z) , 2 . 5 5 - 2 . 7 0 (m , 2 H) , 3 . 2 0 - 3 . 2 5 (m , 2 H) , 3 . 3 0 - 3 . 4 0 (m , 2 H) , 3 . 4 5 - 3 . 5 0 (m , 2 H) , 3 . 6 8 (b s , 1 H) , 4 . 2 0 (d , 1 H , J = 9 . 0 H z) , 4 . 3 7 (d , 1 H , J = 4 . 8 H z) , 4 . 5 5 (d , 1 H , J = 5 . 4 H z) , 4 . 7 6 (d , 1 H , J = 5 . 4 H z) , 4 . 9 2 (d , 1 H , J = 5 . 4 H z) , 7 . 8 4 (b t , 1 H) .

TOF - MS : m / z 5 2 8 (M + Na)⁺ , 5 4 4 (M + K)⁺ .

20

元素分析値 (C₂₆H₅₁NO₆S として) :

計算値 (%) C , 6 1 . 7 5 ; H , 1 0 . 1 6 ; N 2 . 7 7 ; S , 6 . 3 4

実測値 (%) C , 6 1 . 6 5 ; H , 1 0 . 1 0 ; N 2 . 7 7 ; S , 6 . 3 5

【 0 0 3 6 】

実施例 4

N - [2 - (- D - ガラクトピラノシルオキシ) - 1 - (ヘキシルカルバモイル) エチル] オクタデカノイルアミド [一般式 (6) の化合物] の製造 :

(1) 2 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルチオ) エチルカルバミン酸ベンジル 2 . 4 g と 3 - ヒドロキシ - 2 - (オクタデカノイルアミノ) プロピオン酸メチル 1 g をクロロホルム 3 5 m L に溶かし、0 まで冷却した後、N - ヨードコハク酸イミド 1 . 4 g とトリフルオロメタンスルホン酸 0 . 1 3 m L を加え、室温にて 3 時間攪拌した。次いで、反応液にクロロホルムを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と 1 0 % チオ流酸ナトリウム水溶液で洗浄した。クロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、硫酸マグネシウムを濾別し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; n - ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) で精製することによって、2 - (オクタデカノイルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルオキシ) プロピオン酸メチルを 1 . 4 g 得た。

30

【 0 0 3 7 】

(2) 2 - (オクタデカノイルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルオキシ) プロピオン酸メチル 1 . 4 g をピリジン 2 6 m L に溶かし、ヨウ化リチウム 1 . 7 g を加えた後、窒素雰囲気下で 4 時間加熱還流した。反応混合液にクロロホルムを加え、2 m o l / L 塩酸で洗浄し、クロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、次いで減圧下溶媒を留去した。最後に得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; クロロホルム : メタノール = 6 0 : 1) で精製することによって、2 - (オクタデカノイルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルオキシ) プロピオン酸を 9 4 0 m g 得た。

40

【 0 0 3 8 】

(3) 2 - (オクタデカノイルアミノ) - 3 - (2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - ベンゾイル - - D - ガラクトピラノシルオキシ) プロピオン酸 9 4 0 m g を DMF 1 0 m L に溶

50

かし、 n -ヘキシルアミン 120 mg、EDC 285 mg、HOBt 201 mg を加え、室温にて 4 時間攪拌した。反応混合液にクロロホルムを加え、2 mol/L 塩酸と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、クロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、次いで減圧下で溶媒を留去した。最後に得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ - (溶出溶媒： n -ヘキサン：酢酸エチル = 3 : 1) で精製することによって、N - [1 - (ヘキシルカルバモイル) - 2 - (2, 3, 4, 6 - テトラ - O - ベンゾイル - D - ガラクトピラノシルオキシ) エチル] オクタデカノイルアミドを 295 mg 得た。

【0039】

(4) N - [1 - (ヘキシルカルバモイル) - 2 - (2, 3, 4, 6 - テトラ - O - ベンゾイル - D - ガラクトピラノシルオキシ) エチル] オクタデカノイルアミド 290 mg を 1, 4 - ジオキサン 5 mL とメタノール 5 mL の混合溶媒に溶かし、28% ナトリウムメチラートメタノール溶液を触媒量加え、室温で 3 時間攪拌した。反応混合液を陽イオン交換樹脂 (ダウエックス 50W - X8) を用いて中和した後、樹脂を濾別し、濾液を減圧濃縮した。最後に得られた残渣を蒸留水で結晶化することによって、N - [2 - (D - ガラクトピラノシルオキシ) - 1 - (ヘキシルカルバモイル) エチル] オクタデカノイルアミドを白色の結晶として 144 mg 得た。

【0040】

NMR (DMSO - d_6) : 0.85 (t, 6H, $J = 6.0$ Hz), 1.24 (s, 34H), 1.30 - 1.40 (m, 2H), 1.40 - 1.50 (m, 2H), 2.10 - 2.15 (m, 2H), 3.00 - 3.10 (m, 2H), 3.34 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz), 3.45 - 3.55 (m, 3H), 3.62 (bs, 1H), 3.89 (dd, 1H, $J = 4.8, 10.2$ Hz), 4.07 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 4.35 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz), 4.40 (dt, 1H, $J = 5.4, 7.8$ Hz), 4.55 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.69 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.85 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 7.67 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.85 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz).

TOF - MS : m/z 639 ($M + Na$)⁺, 655 ($M + K$)⁺.

元素分析値 ($C_{33}H_{64}N_2O_8$ として) :

計算値 (%) C, 64.25; H 10.46; N, 4.54

実測値 (%) C, 64.02; H 10.32; N, 4.55

【0041】

試験例 1 表皮細胞の - グルコセレブロシダーゼ活性化能測定試験

(1) 方法

(a) 培養表皮細胞

ヒト正常表皮角化細胞は市販されているもの (Epidercell : クラボウ社製) を用いた。

【0042】

(b) 細胞培養用培地

培地としては Medium 154 S (クラボウ社製)、又増殖因子としてこれに添加する添加剤 HKGS (クラボウ社製) を用いた。

【0043】

(c) HEPES 緩衝液の調製

HEPES 7.15 g、グルコース 1.8 g、塩化カリウム 0.22 g、塩化ナトリウム 7.7 g、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 0.27 g を精製水に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液にて pH 7.4 に調整後、1 L にメスアップした。

【0044】

(d) 細胞培養

ヒト正常表皮細胞の細胞数を Medium 154 S にて 2.5×10^4 個/mL に調整し、60 mm コラーゲンコートプレート (ファルコン社製) に 4 mL ずつ播種し、95% 空気 (V/V) - 5% 炭酸ガス (V/V) の雰囲気下、37 °C で 4 日間静置培養した。

【0045】

培養上清を吸引除去し、前記実施例1、2、4で製造した各薬剤の $200\mu\text{mol/L}$ のエタノール溶液を終濃度 $5\mu\text{mol/L}$ となるように添加したMedium154Sを4mLずつ各ディッシュに加えた。このディッシュを95%空気(V/V)-5%炭酸ガス(V/V)の雰囲気下、37℃で4日間静置培養した。また、ガラクトシルセラミド類縁体含有しないエタノールのみを比較例1とした。

【0046】

(e) 粗酵素液の抽出

培養上清を吸引除去し、1mLのリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄した後、細胞をセルスクレーパー(住友ベークライト社製)でディッシュからかきとった。これに 0.1mmol/L フッ化フェニルメチルスルホニル含有リン酸緩衝生理食塩水を添加し、超音波処理装置(ソニックスアンドマテリアルズ社製)で破碎し、遠心上清を粗酵素液として回収した。

【0047】

(f) -グルコセレブロシダーゼ活性測定

ミエルとファンデルフルクの方法(ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・デルマトロジー、95巻、頁271-274、1976年)に準じて測定した。すなわち、粗酵素液 $50\mu\text{L}$ に、 100mmol/L クエン酸- 200mmol/L リン酸緩衝液(pH5.6)を $500\mu\text{L}$ と、 10mmol/L タウロコール酸- 100mmol/L クエン酸- 200mmol/L リン酸緩衝液(pH5.6) $500\mu\text{L}$ を加えて、37℃で10分間加温した。次いで 0.5mmol/L の4-メチルウンベリフェル-D-グルコシド(シグマ社製)を $50\mu\text{L}$ 加えて、37℃で60分間加温した。その後、 200mmol/L 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH10.5)を加え、励起波長360nm、吸収波長450nmで蛍光強度を測定した。標準品の4-メチルウンベリフェロン(シグマ社製)の蛍光強度より作成した検量線をもとに酵素活性を計算した。

【0048】

(2) 結果

図1に示すように、N-[2-(α -D-ガラクトピラノシルオキシ)エチル]オクタデカノイルアミド[実施例2;一般式(4)で示される化合物]、N-[2-(α -D-ガラクトピラノシルチオ-1-(テトラデシルカルバモイル)エチル]オクタデカノイルアミド[実施例1;一般式(5)で示される化合物]、N-[2-(α -D-ガラクトピラノシルオキシ)-1-(ヘキシルカルバモイル)エチル]オクタデカノイルアミド[実施例4;一般式(6)で示される化合物]は、すべて α -グルコセレブロシダーゼ活性化効果が認められた。

【0049】

試験例2 マウスにおける荒れ肌回復試験

(1) 方法

(a) 実験動物

試験開始時9週齢のヘアレスマウス1群5匹を用いた。

【0050】

(b) 測定装置及び条件

経皮水分蒸散量(以下、TEWLと略記する)は、連続発汗測定装置ハイドログラフAMU-100(ケイアンドエス社製)を用いて次のとおり測定した。1平方センチメートルのカプセルを皮膚に密着させ、カプセル内に窒素ガスを導入(300mL/min)し、カプセルに送り出す前とカプセルから回収した後の窒素ガス中の水蒸気量を測定した。この値の差から、1分当たり皮膚1平方センチメートルから蒸散する水分量(mg/cm^2)を算出し、TEWLとした。

【0051】

(b) 試料と実験方法

基剤(プロピレングリコール:エタノール=3:7)を用い、実施例4の化合物[一般式

10

20

30

40

50

(6)で示される化合物]を0.1%、1.0%の濃度に調製した。この調製後の試料0.05mLを予めTEWLを測定したヘアレスマウスの背部皮膚(直径2.5cm)に1日1回、一週間に5回の頻度で4週間連続の塗布を行なった。その後、事前塗布の最終塗布から3日目に紫外線B波長(UVB)を0.15J/cm²、1回照射した。UVB照射前、照射後3及び4日目のTEWLを測定し、基剤塗布前のTEWLに対する比率で比較評価した。

【0052】

(2)結果

図2及び3に示すように、N-[2-(α -D-ガラクトピラノシルオキシ)-1-(ヘキシルカルバモイル)エチル]オクタデカノイルアミド[実施例4の化合物;一般式(6)の化合物]は、1.0%の濃度で $p < 0.01$ (Dunnett多重検定)の危険率で、基剤のみと比して有意にTEWLの値が減少し、荒れ肌が改善されていた。

10

【0053】

実施例5

実施例1~4で得たガラクトシルセラミド類縁体の10%エタノール溶液10gを湯浴で80℃に加温し、混合した下記成分を加えて100gの4種のローションを得た。

【0054】

乳酸	0.3g
クエン酸ナトリウム	0.1g
グリセリン	2.0g
防腐剤、香料及び界面活性剤	適量
精製水	100gを総量とする残量

20

【0055】

【発明の効果】

以上記載の如く、本発明は簡便かつ容易に合成可能な、表皮の α -グルコセレブロシダーゼ活性化剤を提供できることは明らかである。また、本発明によって荒れ肌の予防と防御および各種皮膚疾患の改善が可能となる。

【図面の簡単な説明】

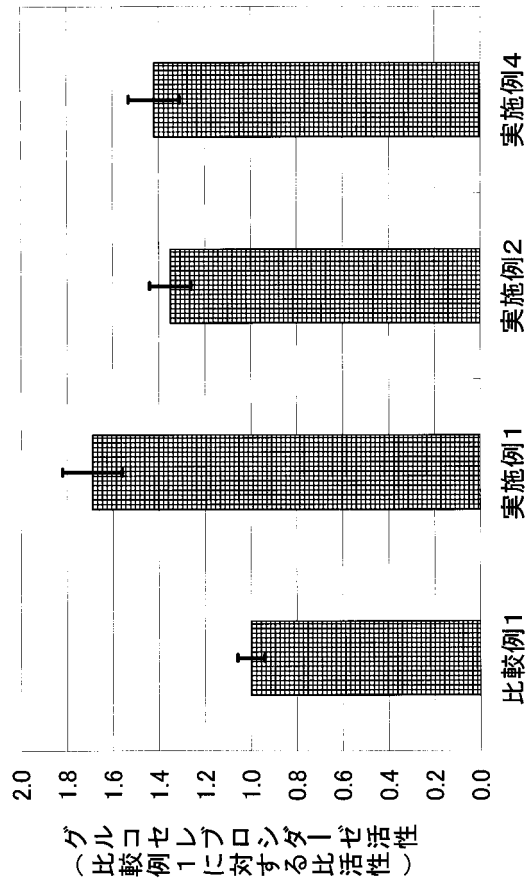
【図1】表皮細胞の α -グルコセレブロシダーゼ活性化能測定試験(試験例1)の結果を示す図である。

30

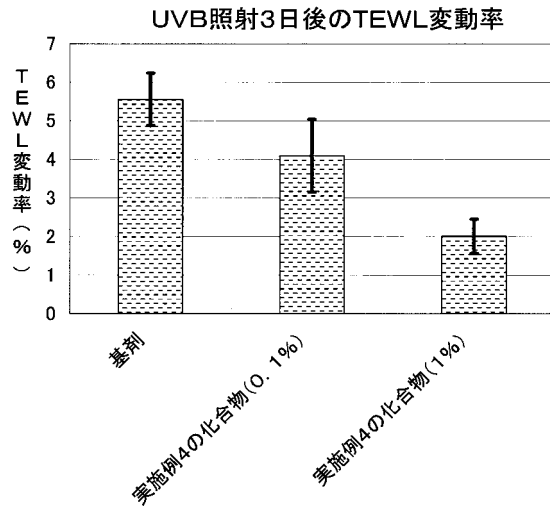
【図2】UVBによる荒れ肌に対する実施例4の化合物塗布の効果(試験例2の結果)を示す図である。

【図3】UVBによる荒れ肌に対する実施例4の化合物塗布の効果(試験例2の結果)を示す図である。

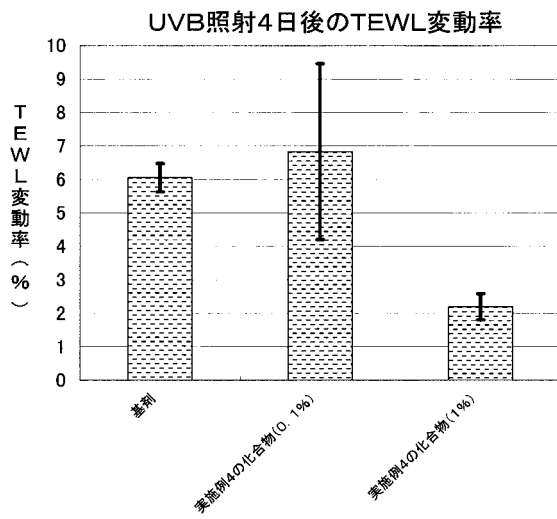
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K 31/7028 (2006.01)

A 6 1 K 8/00

A 6 1 P 17/16 (2006.01)

A 6 1 K 31/7028

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 17/16

A 6 1 Q 19/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 Q 19/00

(72)発明者 原 真理子

神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 カネボウ株式会社 基礎科学研究所内

(72)発明者 井上 紳太郎

神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 カネボウ株式会社 基礎科学研究所内

(72)発明者 西村 紳一郎

北海道札幌市北区北10条西8丁目北海道大学大学院 理学研究科西村研究室内

審査官 原田 隆興

(56)参考文献 特開平05-202085(JP,A)

特開平05-186491(JP,A)

国際公開第95/025736(WO,A1)

国際公開第00/044345(WO,A1)

特開2000-143598(JP,A)

Biol. Pharm. Bull., 1995年, Vol.18, No.5, pages 740-746

Carbohydrate Research, 2000年, Vol.327, pages 223-260

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CA(STN)

REGISTRY(STN)

WPIDS(STN)

A61K 8/00