

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6420074号
(P6420074)

(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/122	(2006.01)	A 6 1 K 31/122
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02

請求項の数 3 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2014-130876 (P2014-130876)	(73) 特許権者	504132272 国立大学法人京都大学
(22) 出願日	平成26年6月26日(2014.6.26)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(65) 公開番号	特開2015-28005 (P2015-28005A)	(73) 特許権者	505314022 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
(43) 公開日	平成27年2月12日(2015.2.12)		大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号
審査請求日	平成29年6月20日(2017.6.20)	(74) 代理人	100077012 弁理士 岩谷 龍
(31) 優先権主張番号	特願2013-135040 (P2013-135040)	(72) 発明者	妻木 範行 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内
(32) 優先日	平成25年6月27日(2013.6.27)	(72) 発明者	竹森 洋 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 独立行政法人医薬基盤研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		最終頁に続く

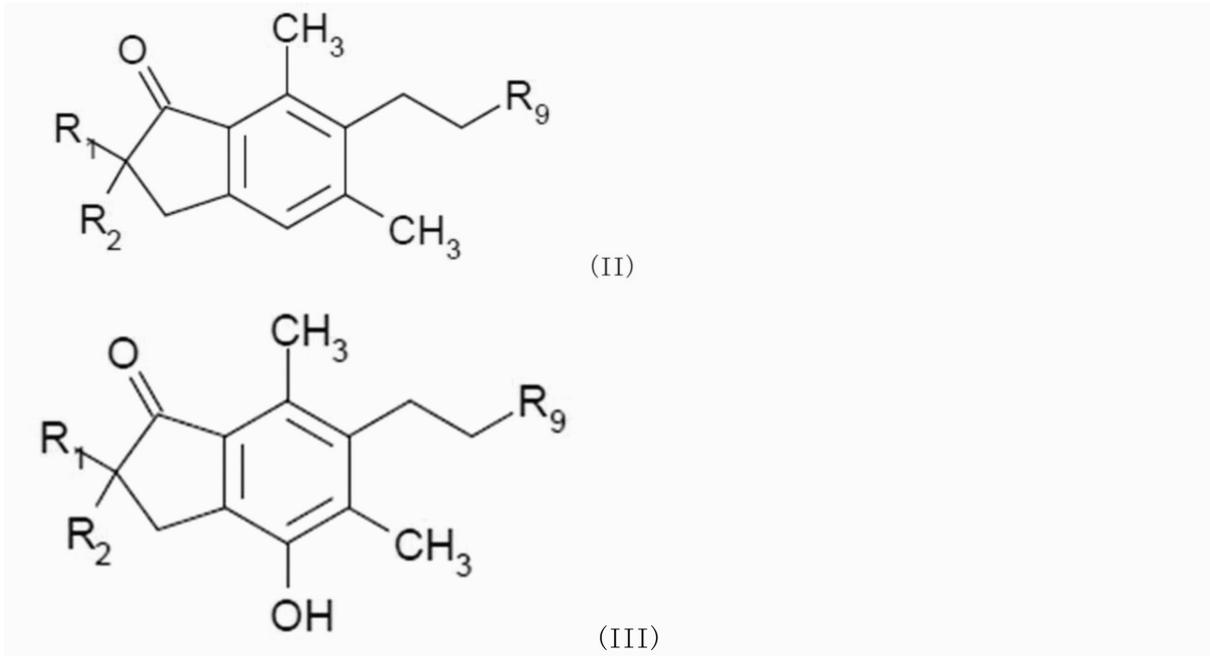
(54) 【発明の名称】 プテロシン誘導体を含む軟骨欠損、軟骨変性、および／または軟骨菲薄疾患治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(II)または式(III)：

【化1】



10

(式中、 R_1 および R_2 が、それぞれ独立して、水素、メチル基またはヒドロキシメチル基であり、 R_9 が、ヒドロキシ基、メトキシ基または塩素である)

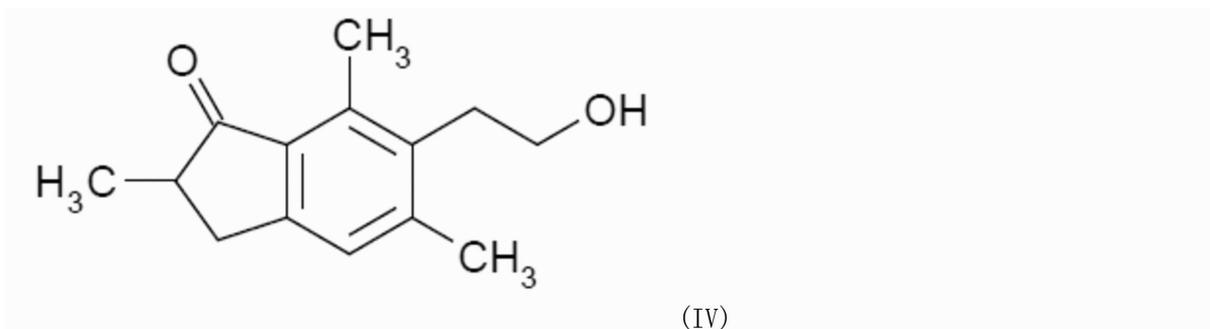
20

で表されるプレロシン誘導体またはその薬学的に許容し得る塩を含有することを特徴とする、軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患の治療剤。

【請求項2】

前記プレロシン誘導体が、式(IV)：

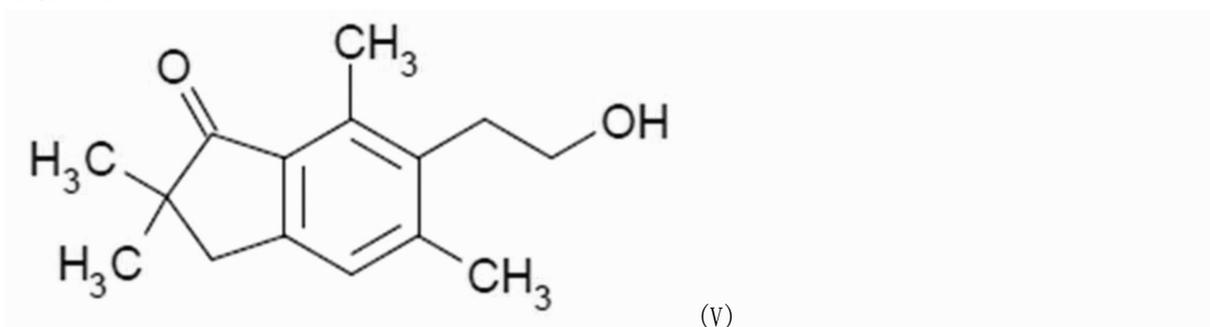
【化2】



30

式(V)：

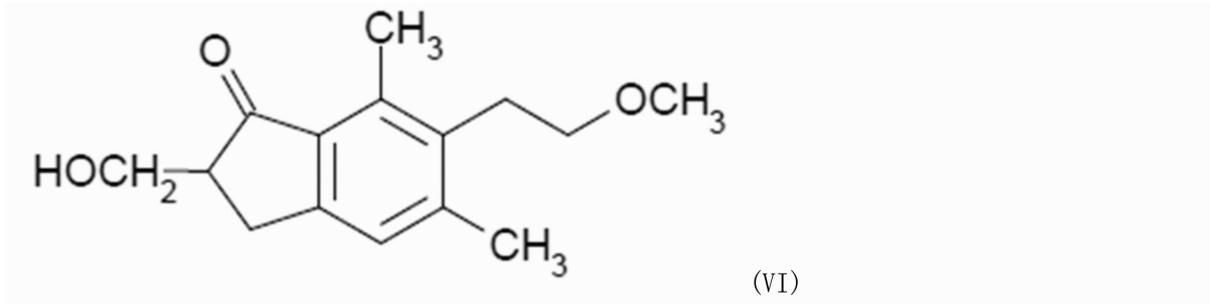
【化3】



40

式(VI)：

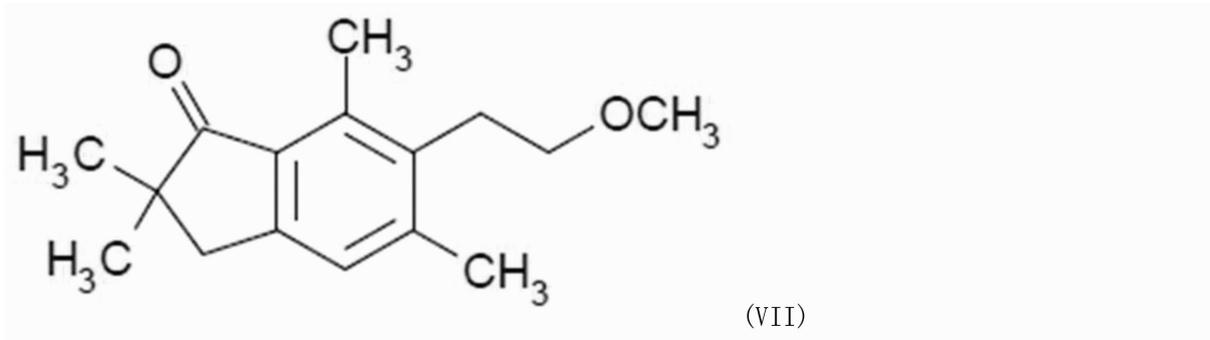
【化 4】



式 (VII) :

10

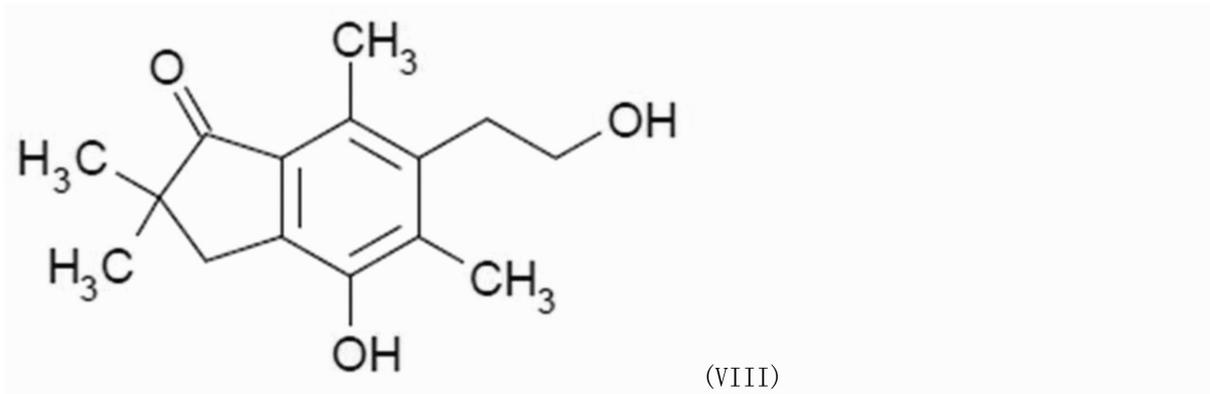
【化 5】



20

式 (VIII) :

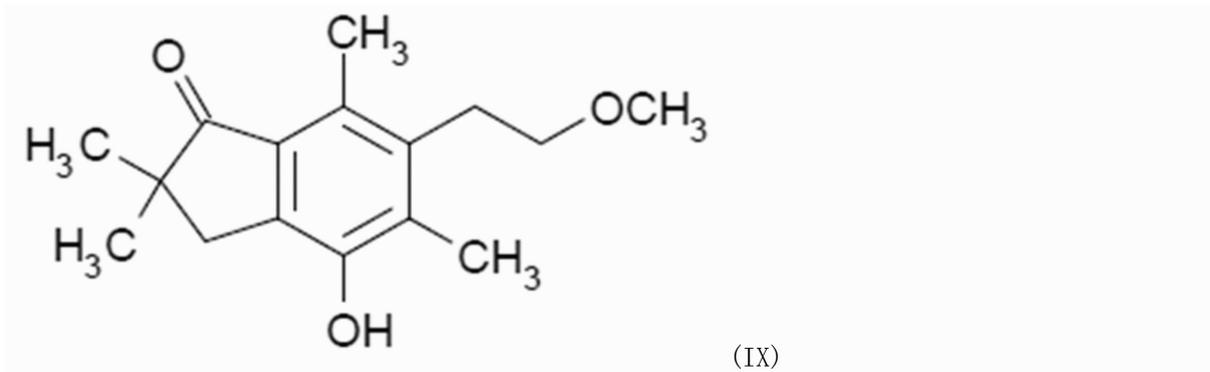
【化 6】



30

式 (IX) :

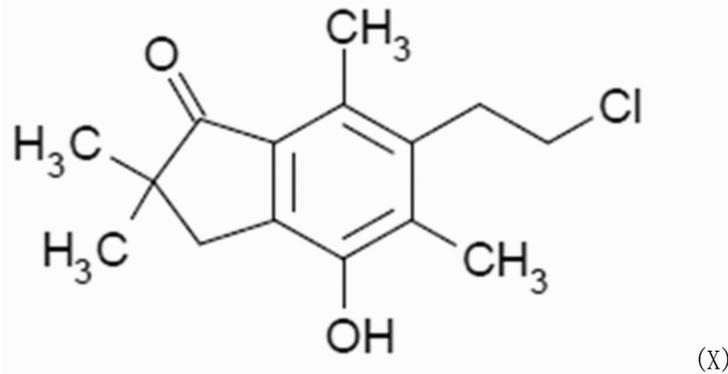
【化 7】



40

または式 (X) :

【化8】



10

で表される化合物である、請求項1に記載の治療剤。

【請求項3】

前記軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患が、変形関節症である、請求項1または2に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患の治療に有用な治療剤、医薬組成物、機能性食品、及び前記治療剤（又は前記医薬組成物）を用いた前記疾患の治療方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

関節軟骨は可動関節の骨表面を覆い、軟骨基質とわずかな軟骨細胞により構成されており、ほとんど血流がないことから、一度欠損または変性した関節軟骨の回復は困難であると言われている。このような関節軟骨の欠損または変性として、外傷性軟骨疾患、関節リウマチおよび変形性関節症などが例示される。また、加齢変化として関節軟骨は加齢とともに菲薄化する。

【0003】

ここで、変形性関節症は、関節軟骨の変性と軟骨下骨の増殖および再形成に特徴付けられる進行性の変性関節疾患である。症状は、硬直、動作制限、疼痛などであり、加齢とともに発生頻度が増加する。しかしながら、軟骨は修復能に乏しいため、変形性関節症の根治方法はなく、運動制限と鎮痛剤で疼痛をコントロールすることが治療の現状である。症状が進行し末期に至った場合には、変性した関節軟骨を切除して金属製の覆いをかぶせる人工関節置換術が行われている。

30

【0004】

軟骨修復促進剤の開発をめざして、軟骨細胞の増殖を促進する化合物やタンパク質が探索されており、S I K 3（特許文献1）を抑制する化合物がその指標となることが報告されている。実際に軟骨を組織として増大させることができるものとしては、骨形成因子（B M P）が知られている。しかしB M Pは、軟骨を増大させた後に、軟骨細胞を肥大化させて骨に置換する作用を有しており、関節軟骨の治療に用いるには問題がある。近年、関節軟骨の変性に軟骨細胞の肥大化促進がかかわることが指摘され、軟骨細胞の肥大化を防ぐことが変形性関節症の治療における一つの主要なターゲットになっている。これまで明らかにされたターゲットとしては、H e d g e h o g（非特許文献1）、H i f - 2 a l p h a（非特許文献2、3）がある。また、一過性にb e t a - c a t e n i nシグナルを活性化させると関節軟骨が肥厚することが報告されている（非特許文献4）。

40

【0005】

また、外傷や血行障害などによる関節軟骨損傷や成長軟骨損傷に対して、幹細胞を利用した細胞移植によって損傷軟骨の再生医療が研究されている。しかし、幹細胞から誘導した軟骨様細胞は肥大化する傾向にあり、問題となっている（非特許文献5）。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】W02012165407

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Lin AC, et al. Nat Med. 2009; 15:1421-1425.

【非特許文献2】Saito T, et al. Nat Med. 2010; 16:678-686.

【非特許文献3】Yang S, et al. Nat Med. 2010; 16:687-693.

【非特許文献4】Yuasa T, et al. Am J Pathol. 2009; 175:1993-2003.

【非特許文献5】Pelttari K, et al. Arthritis Rheum. 2006; 54:3254-3266.

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患の新規治療剤、医薬組成物、機能性食品、及び前記治療剤（又は前記医薬組成物）を用いた前記疾患の治療方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記の課題を解決すべく極めて多数の化合物を用いて鋭意検討を行った結果、驚くべきことにプテロシン誘導体に軟骨細胞の増殖または軟骨基質の産生促進作用または軟骨細胞の肥大化を抑制する作用があることを見出した。これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねて本発明を完成するに至った。

20

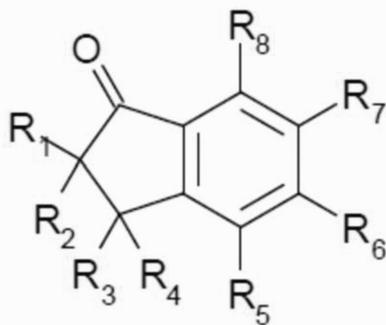
【0010】

すなわち、本発明は、以下を包含する。

[1]式(1)：

【0011】

【化1】



(I)

30

(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が、それぞれ独立して、水素、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、グリコシルオキシ基またはグルコシルオキシアルキル基であり、アミノ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、及びアルキルアミノ基は置換基を有していてもよく、または R_5 、 R_6 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成し、または R_6 、 R_7 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成し、または R_7 、 R_8 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘ

40

50

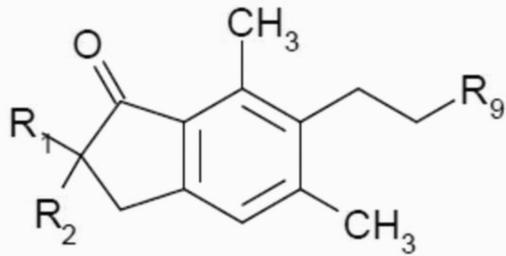
テロ原子を含む 5 ~ 8 員環を形成する。ただし、 R_3 及び R_4 はヒドロキシ基ではない。
)で表されるプテロシン誘導体またはその薬学的に許容し得る塩を含有する、軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患の治療剤。

【0012】

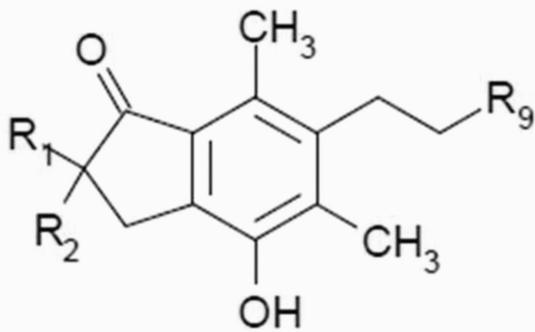
[2] 前記プテロシン誘導体が、式(II)又は式(III)：

【0013】

【化2】



(II)



(III)

(式中、 R_1 および R_2 が、それぞれ独立して、水素、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、グリコシルオキシ基またはグルコシルオキシアルキル基であり、 R_9 が、水素、ヒドロキシ基、カルボキシル基、アミノ基、ハロゲン基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、またはグリコシルオキシ基である)で表される化合物である、[1]に記載の治療剤。

【0014】

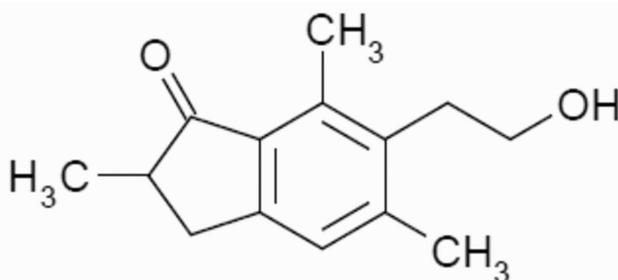
[3] 前記プテロシン誘導体が、式(II)または式(III)で表される化合物であって、式中、 R_1 および R_2 が、それぞれ独立して、水素、メチル基またはヒドロキシメチル基であり、 R_9 が、ヒドロキシ基、メトキシ基または塩素である、[1]または[2]に記載の治療剤。

【0015】

[4] 前記プテロシン誘導体が、式(IV)：

【0016】

【化3】



(IV)

10

20

30

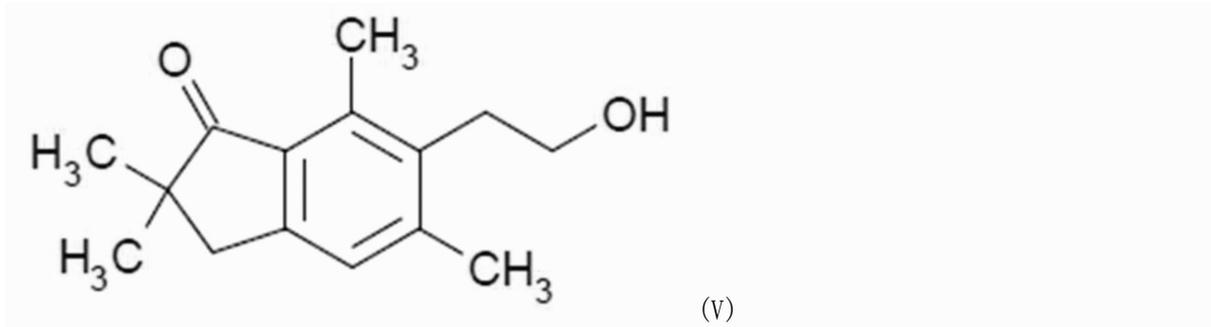
40

50

式 (V) :

【 0 0 1 7 】

【 化 4 】

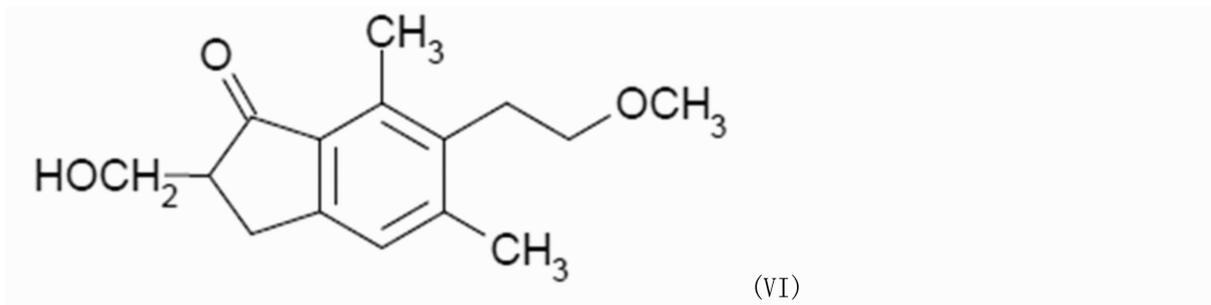


10

式 (VI) :

【 0 0 1 8 】

【 化 5 】

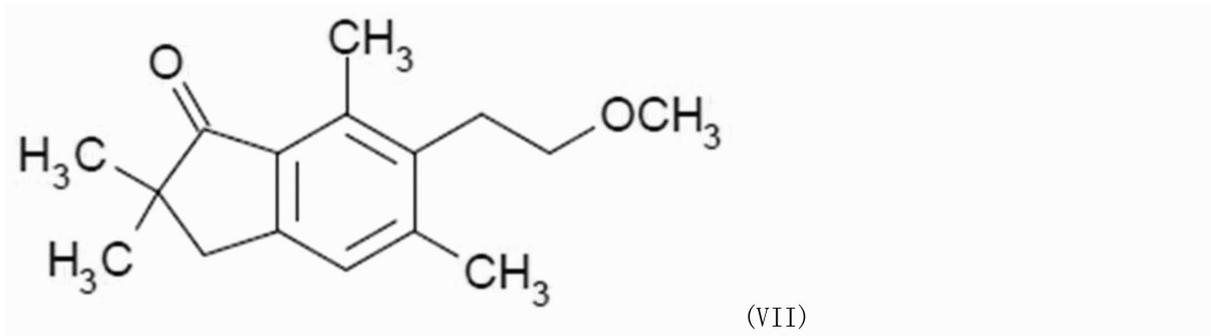


20

式 (VII) :

【 0 0 1 9 】

【 化 6 】

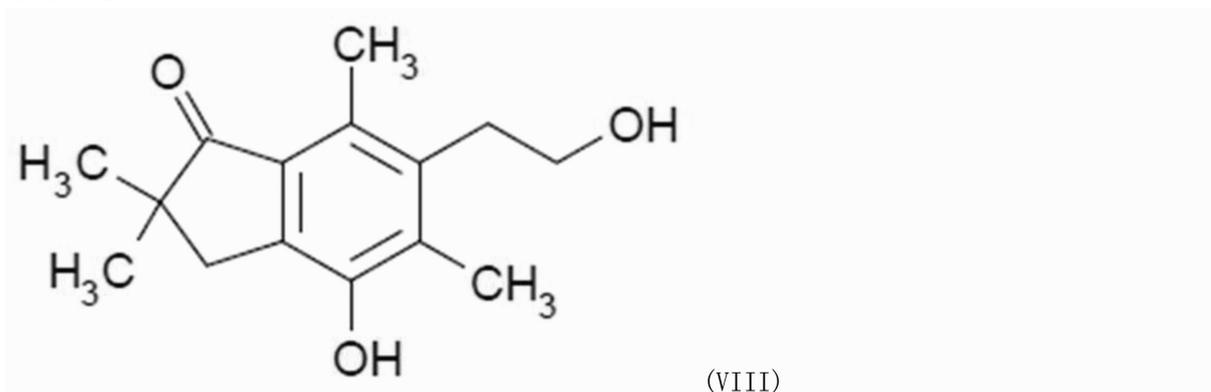


30

式 (VIII) :

【 0 0 2 0 】

【 化 7 】



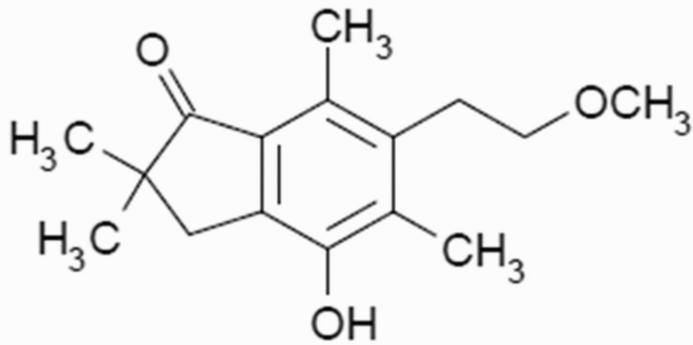
40

式 (IX) :

50

【 0 0 2 1 】

【 化 8 】



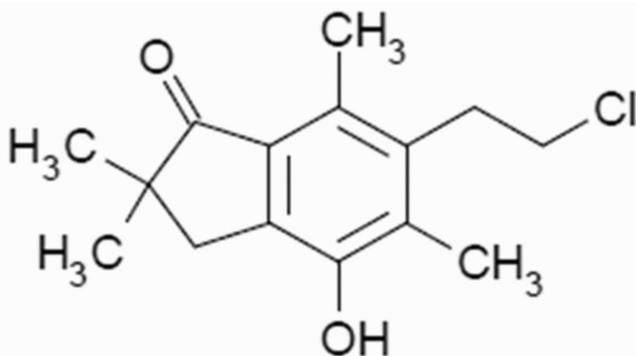
(IX)

10

または式 (X) :

【 0 0 2 2 】

【 化 9 】



(X)

20

で表される化合物である、[1] から [3] のいずれかに記載の治療剤。

【 0 0 2 3 】

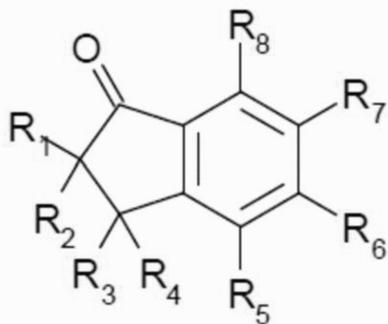
[5] 前記軟骨欠損、軟骨変性、および/または菲薄疾患が、変形関節症である、[1] から [4] のいずれかに記載の治療剤。

【 0 0 2 4 】

[6] 式 (I) :

【 0 0 2 5 】

【 化 1 0 】



(I)

40

(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が、それぞれ独立して、水素、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリーール基、ヘテロアリーール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、グリコシルオキシ基またはグルコシルオキシアルキル基であり、アミノ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリーール基、ヘテロアリーール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシル

50

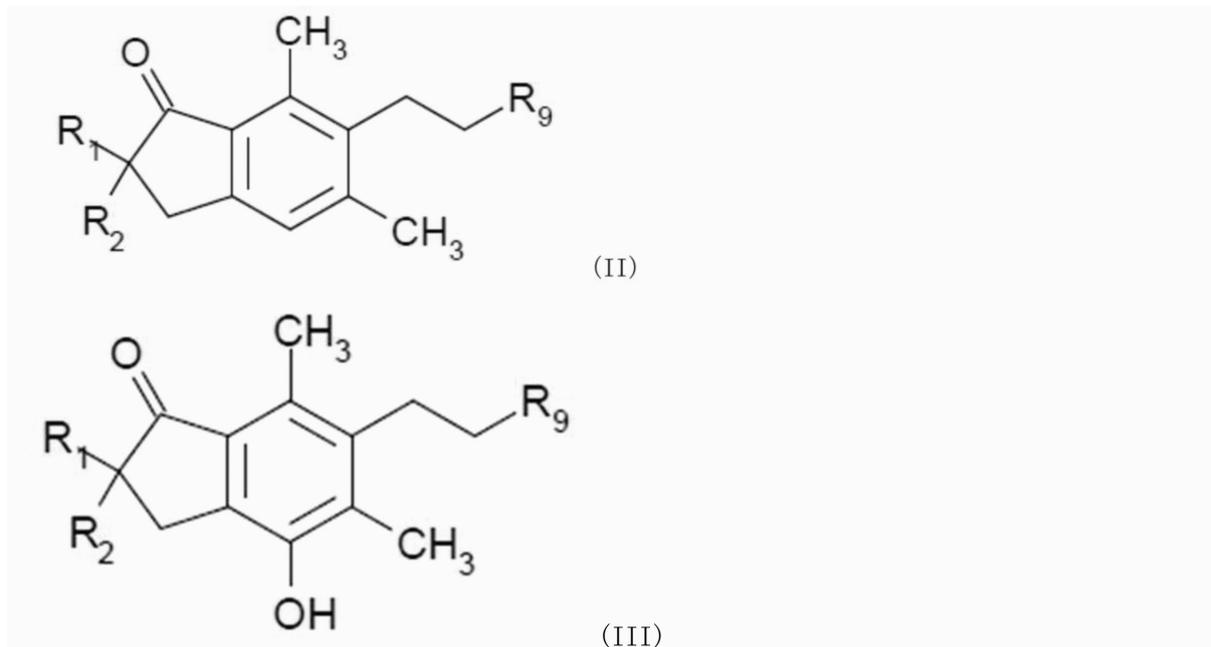
オキシ基、アルキルチオ基、及びアルキルアミノ基は置換基を有していてもよく、または R_5 、 R_6 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成し、または R_6 、 R_7 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成し、または R_7 、 R_8 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成する。ただし、 R_3 及び R_4 はヒドロキシ基ではない。
)で表されるプテロシン誘導体またはその薬学的に許容し得る塩を含有する、軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患の治療用の機能性食品。

【0026】

[7] 前記プテロシン誘導体が、式(II)又は式(III)：

【0027】

【化11】



(式中、 R_1 および R_2 が、それぞれ独立して、水素、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、グリコシルオキシ基またはグルコシルオキシアルキル基であり、 R_9 が、水素、ヒドロキシ基、カルボキシル基、アミノ基、ハロゲン基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、またはグリコシルオキシ基である) で表される化合物である、[6]に記載の機能性食品。

【0028】

[8] 前記プテロシン誘導体が、式(II)または式(III)で表される化合物であって、式中、 R_1 および R_2 が、それぞれ独立して、水素、メチル基またはヒドロキシメチル基であり、 R_9 が、ヒドロキシ基、メトキシ基または塩素である、[6]または[7]に記載の機能性食品。

【0029】

[9] 前記プテロシン誘導体が、式(IV)：

【0030】

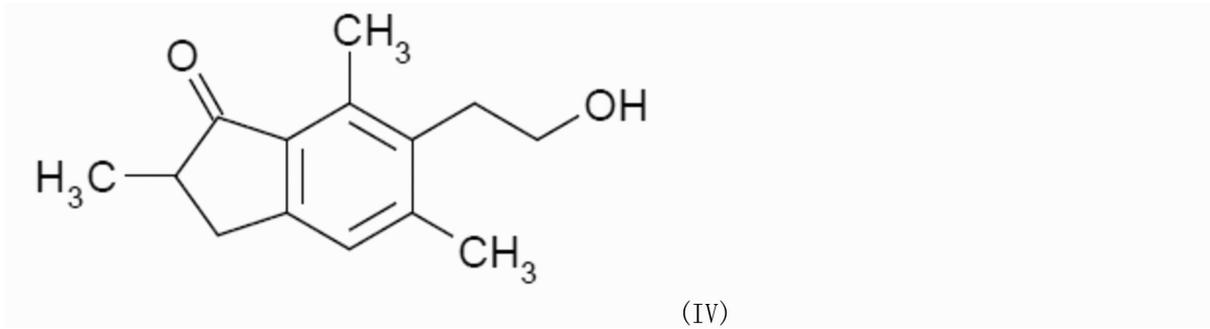
10

20

30

40

【化 1 2】

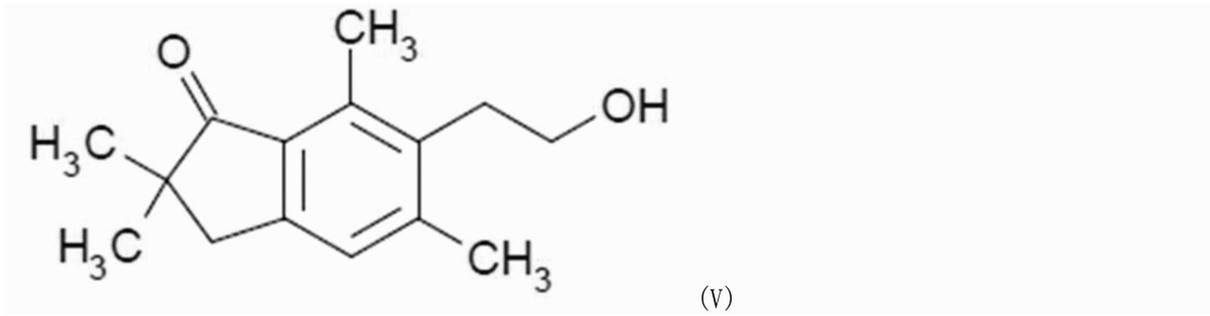


10

式 (V) :

【 0 0 3 1】

【化 1 3】

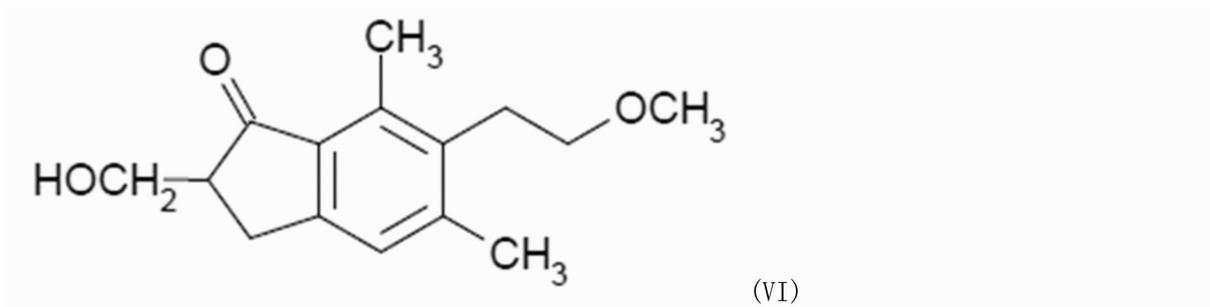


20

式 (VI) :

【 0 0 3 2】

【化 1 4】

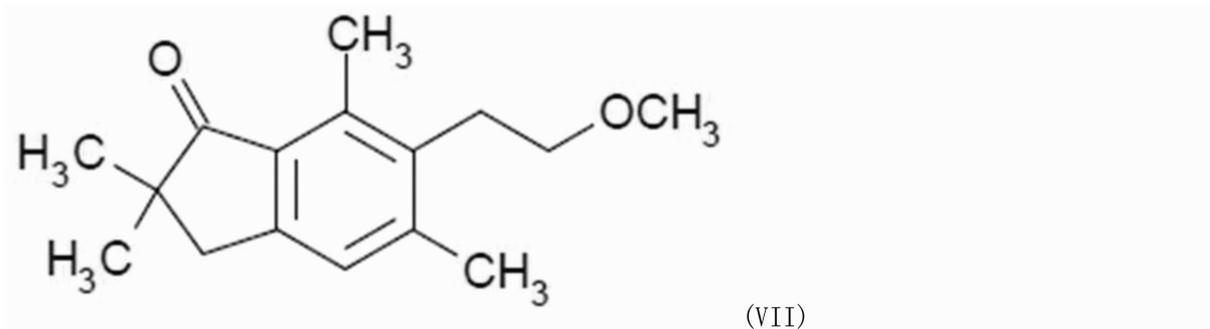


30

式 (VII) :

【 0 0 3 3】

【化 1 5】

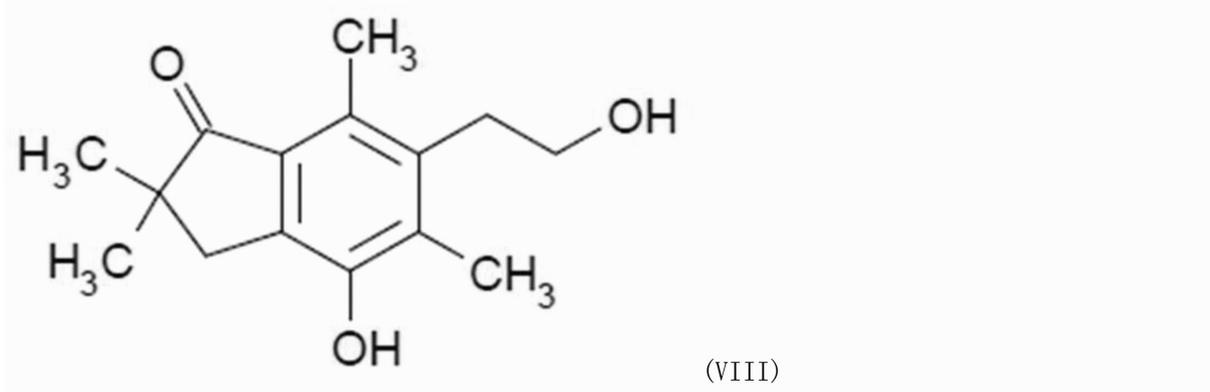


40

式 (VIII) :

【 0 0 3 4】

【化16】

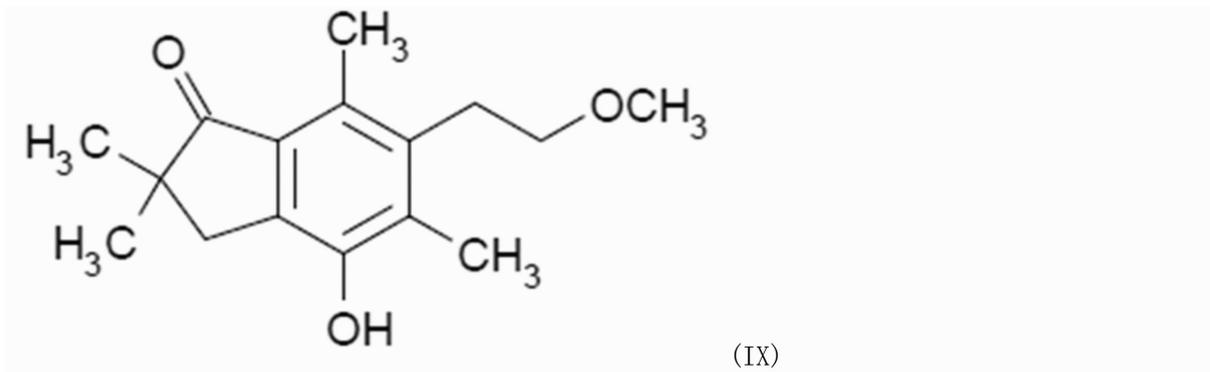


10

式(IX) :

【0035】

【化17】

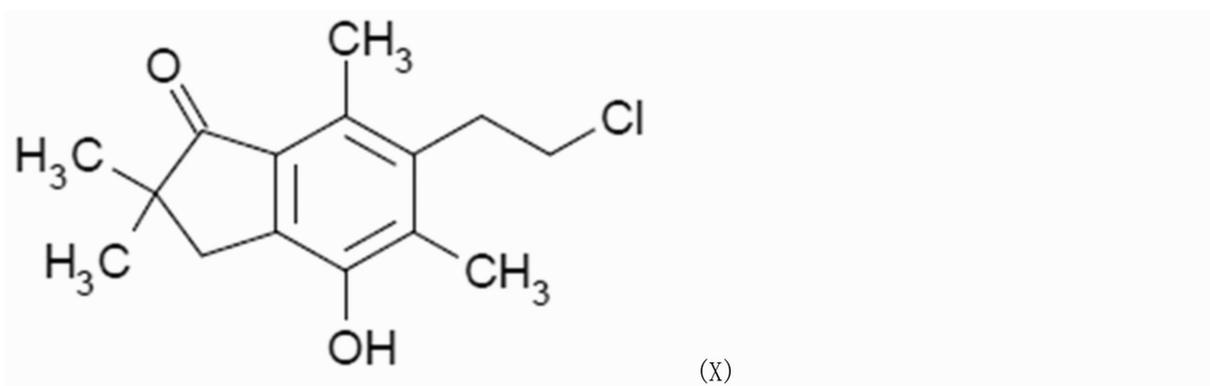


20

または式(X) :

【0036】

【化18】



30

で表される化合物である、[6]から[8]のいずれかに記載の機能性食品。

【0037】

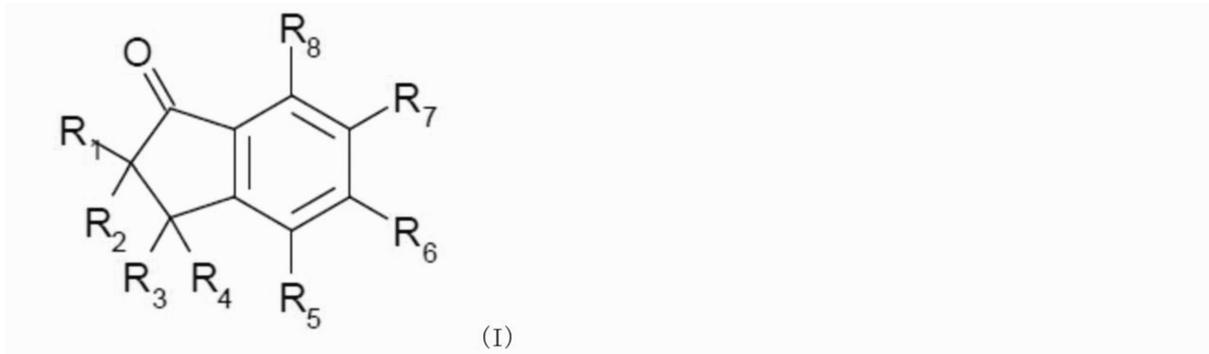
[10]前記軟骨欠損、軟骨変性、および/または菲薄疾患が、変形関節症である、[6]から[9]のいずれかに記載の機能性食品。

[11]式(1) :

【0038】

40

【化19】



10

(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 および R_8 が、それぞれ独立して、水素、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、グリコシルオキシ基またはグルコシルオキシアルキル基であり、アミノ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、及びアルキルアミノ基は置換基を有していてもよく、または R_5 、 R_6 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成し、または R_6 、 R_7 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成し、または R_7 、 R_8 、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成する。ただし、 R_3 及び R_4 はヒドロキシ基ではない。) で表されるプテロシン誘導体またはその薬学的に許容し得る塩(またはプテロシン誘導体またはその薬学的に許容しうる塩を含む医薬組成物)を患者に投与する工程を含む、軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患の予防および/または治療方法。

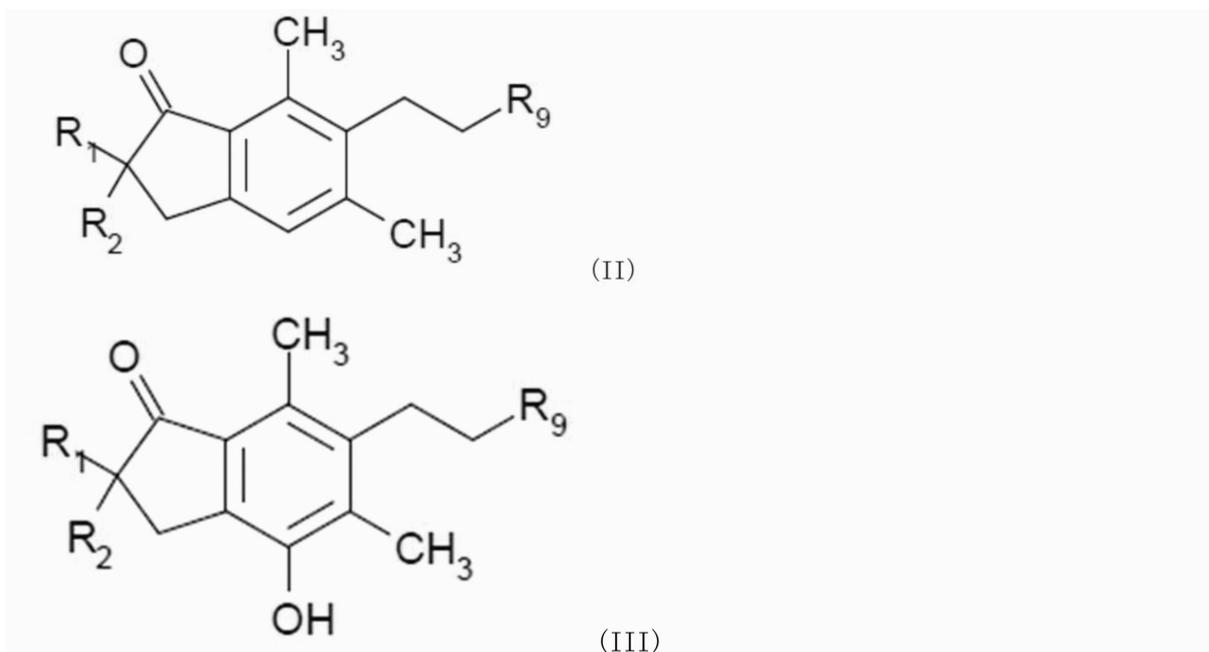
20

【0039】

[12] 前記プテロシン誘導体が、式(II)又は式(III)：

【0040】

【化20】



40

(式中、 R_1 および R_2 が、それぞれ独立して、水素、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアル

50

キル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、グリコシルオキシ基またはグルコシルオキシアルキル基であり、R₉が、水素、ヒドロキシ基、カルボキシル基、アミノ基、ハロゲン基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、またはグリコシルオキシ基である)で表される化合物である、[11]に記載の方法。

【0041】

[13]前記プテロシン誘導体が、式(II)または式(III)で表される化合物であって、式中、R₁およびR₂が、それぞれ独立して、水素、メチル基またはヒドロキシメチル基であり、R₉が、ヒドロキシ基、メトキシ基または塩素である、[11]または[12]に記載の方法。

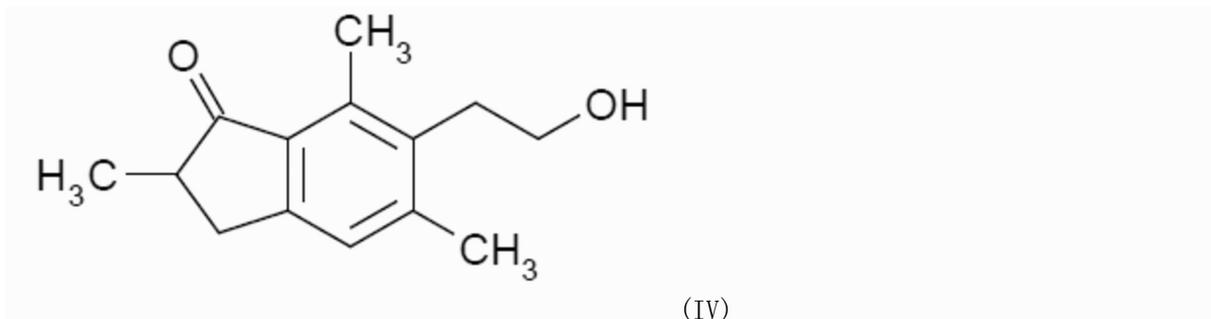
10

【0042】

[14]前記プテロシン誘導体が、式(IV)：

【0043】

【化21】

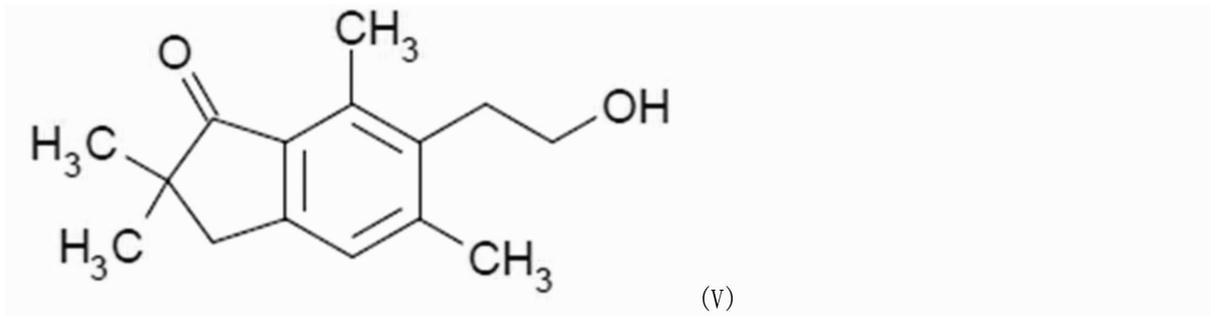


20

式(V)：

【0044】

【化22】

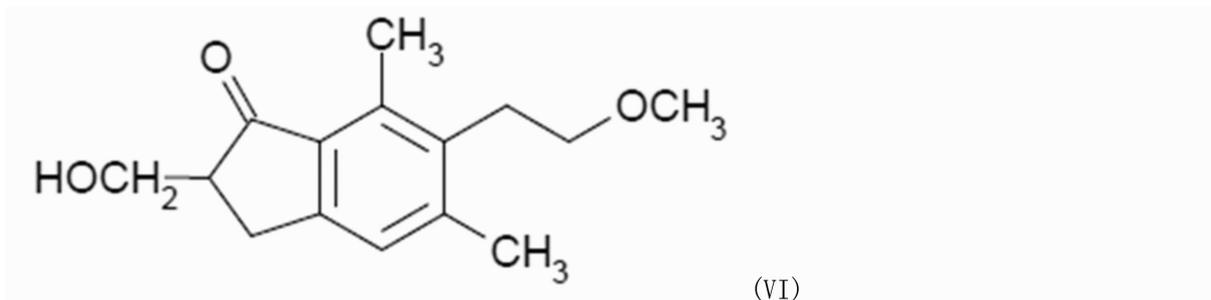


30

式(VI)：

【0045】

【化23】

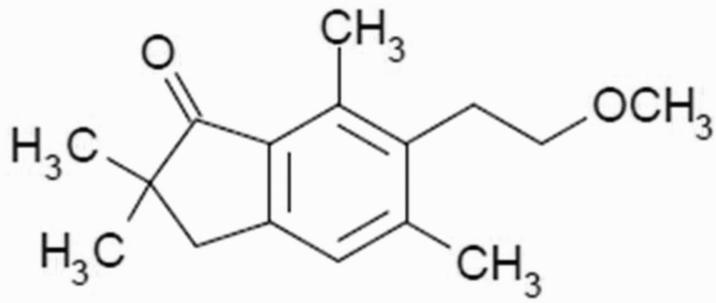


40

式(VII)：

【0046】

【化 2 4】



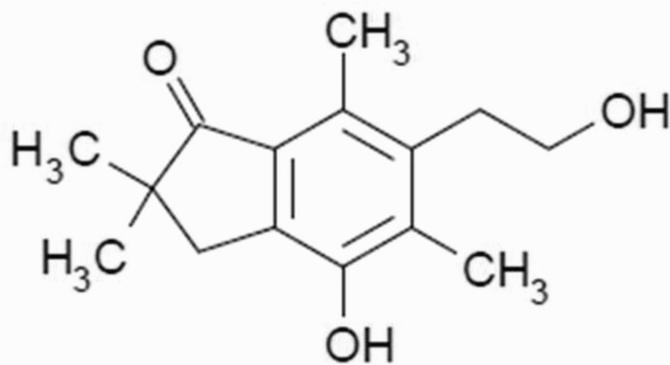
(VII)

10

式 (VIII) :

【 0 0 4 7】

【化 2 5】



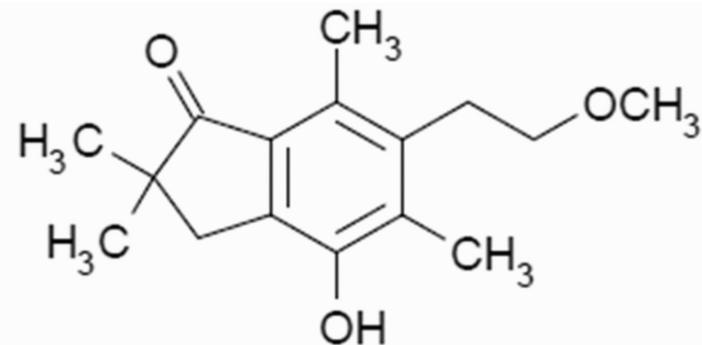
(VIII)

20

式 (IX) :

【 0 0 4 8】

【化 2 6】



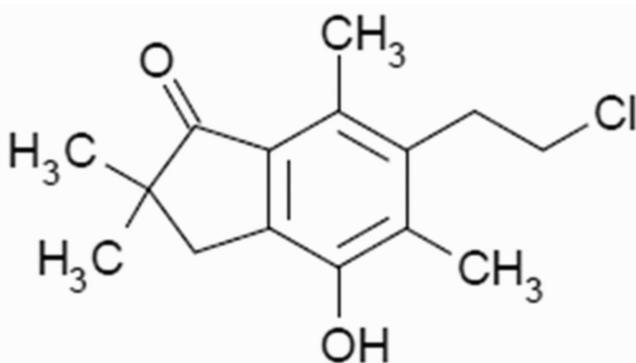
(IX)

30

または式 (X) :

【 0 0 4 9】

【化 2 7】



(X)

40

で表される化合物である、[1 1] から [1 3] のいずれかに記載の方法。

【 0 0 5 0 】

[1 5] 前記軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患が、変形関節症である、[1 1] から [1 4] のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【 0 0 5 1 】

本発明によれば、プテロシン誘導体は、軟骨細胞の増殖作用および軟骨基質の産生増加作用および軟骨細胞の肥大化を抑制する作用を有することから、軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患患者へ投与することで、治療薬への適用が可能となる。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 5 2 】

【図 1】図 1 A は、対照 (DMSO) または各濃度のプテロシン B (Pterosin B) を添加して培養した後の野生型マウス初代軟骨細胞のペレットのサフラニン O 染色像を示す。図 1 B は、対照 (DMSO) または各濃度のプテロシン B を添加して培養した野生型マウス初代軟骨細胞における Col12a1 および Col10a1 の定量 P C R の結果を示す。

【図 2】図 2 は、対照 (DMSO)、合成プテロシン B (Pterosin B (Synthesis)) または抽出プテロシン B (Pterosin B (Extract)) を添加して組織培養した後のマウス胎児中足骨のサフラニン O および B r d U の染色像を示す。図中、線は、増殖軟骨細胞の位置を示す。

【図 3】図 3 A は、対照 (DMSO)、合成プテロシン B (Pterosin B (Synthesis)) または抽出プテロシン B (Pterosin B (Extract)) を添加して組織培養した後のマウス胎児中足骨のサフラニン O および B r d U の代表的な染色像を示す。図中、線は、増殖軟骨細胞の位置を示す。図 3 B は、増殖軟骨細胞領域の長さを定量化したグラフを示す。

20

【図 4】図 4 は、対照 (DMSO)、合成プテロシン B (Pterosin B (Synthesis)) または抽出プテロシン B (Pterosin B (Extract)) を添加して組織培養した後のマウス胎児中足骨の Col10a1 と DAPI の代表的な染色像を示す。

【図 5】図 5 A は、培養 3 日目のヒト初代軟骨細胞の位相差像およびペレットの作製スキームを示す。図 5 B は、対照 (DMSO) またはプテロシン B を添加して培養したヒト初代軟骨細胞のペレットの 2 週間後および 4 週間後のサフラニン O 染色像を示す。

【図 6】図 6 は、ヒト線維芽細胞 (HDF)、ヒト関節軟骨細胞 (HAC) および対照 (DMSO) またはプテロシン B を添加して 2 週間培養したヒト初代軟骨細胞のペレットにおける COL2A1、COL11A2、ACAN、SOX9、COL10A1 および COL1A1 の定量 P C R の結果を示す。

30

【図 7】図 7 A は、関節軟骨の面積の測定方法を示す。図 7 B は、対照 (DMSO) またはプテロシン B を 4 週間関節腔内投与後の関節におけるサフラニン O 免疫染色像を示す。図 7 C は、対照 (DMSO) またはプテロシン B を 4 週間関節腔内投与後の関節軟骨の面積を測定した結果を示す。

【図 8】図 8 は、各薬剤 (DMSO、プテロシン B (Pterosin B)、オニチン (Onitin)、14-O-メトキシオニチン (14-O-Methylonitin)、プテロシン R (Pterosin R)、14-O-メトキシプテロシン G (14-O-Methylpterosin G)、プテロシン Z (Pterosin Z) およびプテロシン I (Pterosin I)) の SIK3 の抑制活性を意味する CRTC2 活性を測定した結果を示す。DMSO は対照として用いた。

40

【図 9】図 9 は、対照 (DMSO)、プテロシン B (Pterosin B) またはプテロシン Z (Pterosin Z) を添加して培養した野生型マウス初代軟骨細胞における Col10a1 の定量 P C R の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 3 】

本発明は、プテロシン誘導体を含む軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患の治療のための治療剤及び医薬組成物を提供する。

本発明において、治療対象となる軟骨欠損、軟骨変性、および軟骨菲薄疾患は、関節の軟骨を外傷、自己免疫または加齢等により欠損、変性および/または菲薄した病態であり

50

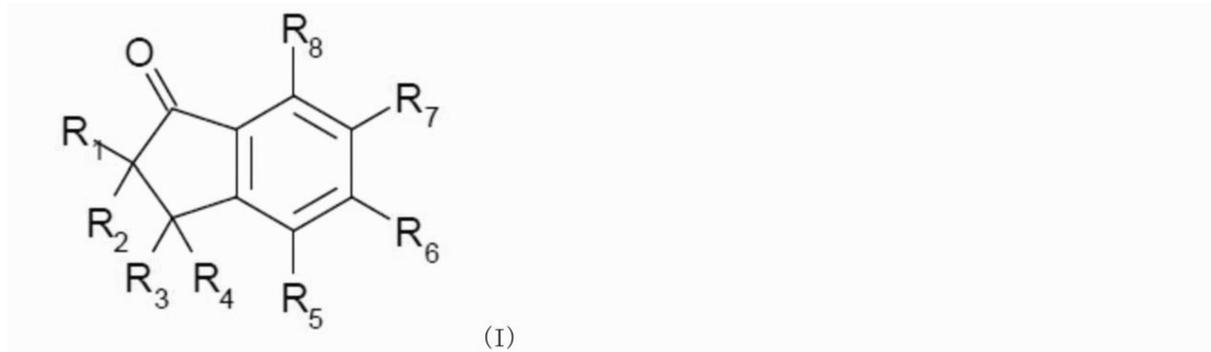
、外傷性軟骨疾患（例えば、離断性骨軟骨炎）、関節リウマチおよび変形性関節症などが例示される。本発明のプテロシン誘導体の効果を考慮すると、完全に軟骨を欠損した病態は望ましくなく、一部の軟骨および軟骨基質を失った病態であることが望ましい。より好ましくは、変形性関節症であり、さらに好ましくは変形性膝関節症である。また、加齢による関節軟骨の菲薄も好ましい。

【0054】

本発明において、プテロシン誘導体とは、例えば、WO2010/085811に記載の化合物が例示され、詳細には、式(I)

【0055】

【化28】



で表される化合物であり、式(I)中、各R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇およびR₈が、それぞれ独立して水素、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基、グリコシル基、グリコシルオキシ基またはグルコシルオキシアルキル基であり、アミノ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、及びアルキルアミノ基は置換基（後述の置換基など）を有していてもよく、またはR₅、R₆、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成し、またはR₆、R₇、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成し、またはR₇、R₈、及びそれらが結合している2個の炭素原子が共同して1、2または3個のヘテロ原子を含む5～8員環を形成することを特徴とする。また、R₁、R₂、R₃およびR₄からなる群から選ばれる2つの基は、それぞれが結合している炭素原子と共同して、3～8員環を形成してもよい。また、R₅、R₆、R₇およびR₈からなる群から選択される2つは、それぞれが結合している炭素原子と共同して、3～8員環を形成してもよい。環を構成する場合、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇およびR₈は、アルキレン基であってもよい。

【0056】

なお、上記式(I)において、R₃及びR₄は、通常、ヒドロキシ基でない場合が多い。特に、本発明では、上記式(I)において、R₃及びR₄が、水素原子（すなわち、R₃及びR₄が無置換）である化合物（例えば、後述の式(II)又は式(III)で表される化合物など）を好適に使用してもよい。

【0057】

本発明において、好ましいプテロシン誘導体は、R₃、R₄、R₅が水素であり、R₆およびR₈がメチル基である式(II)

【0058】

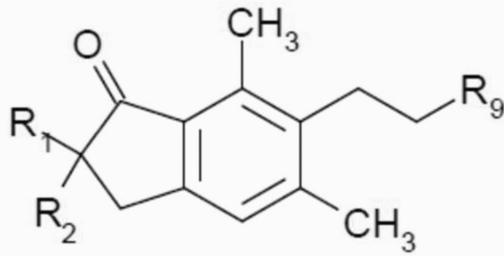
10

20

30

40

【化29】

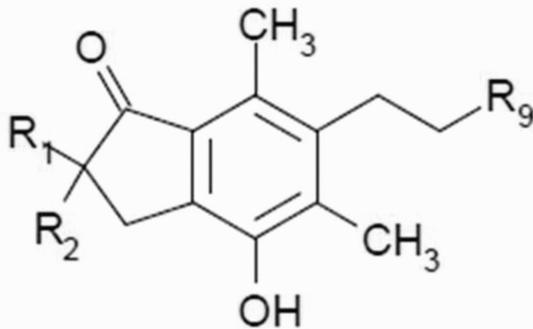


(II)

、または R_3 、 R_4 、が水素であり、 R_5 がヒドロキシ基であり、ならびに R_6 および R_8 がメチル基である式 (III)

【0059】

【化30】



(III)

で表される化合物であり、式中 R_9 は、水素、ヒドロキシ基、カルボキシル基、アミノ基、ハロゲン基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アルキルチオ基、アルキルアミノ基またはグリコシル基、グリコシルオキシ基である。

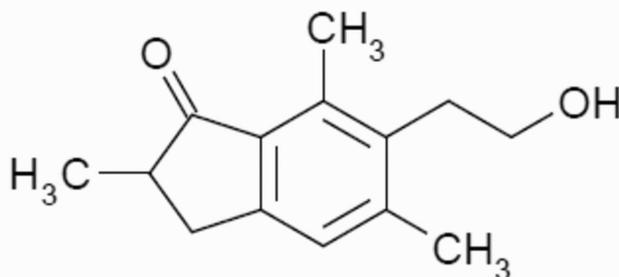
【0060】

さらに好ましいプテロシン誘導体は、式 (II) または式 (III) において、 R_1 および R_2 が、それぞれ独立して、水素、メチル基またはヒドロキシメチル基であり、 R_9 が、ヒドロキシ基、メトキシ基または塩素である化合物である。

最も好ましいプテロシン誘導体は、式 (II) における R_1 がメチル基であり、 R_2 が水素であり、 R_9 がヒドロキシ基である式 (IV)

【0061】

【化31】



(IV)

で表されるプテロシン B、式 (II) における R_1 がメチル基であり、 R_2 がメチル基であり、 R_9 がヒドロキシ基である式 (V)

【0062】

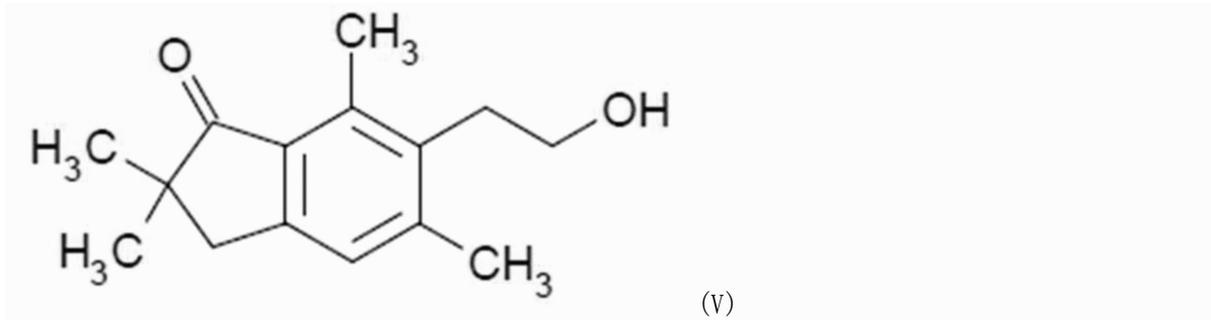
10

20

30

40

【化 3 2】

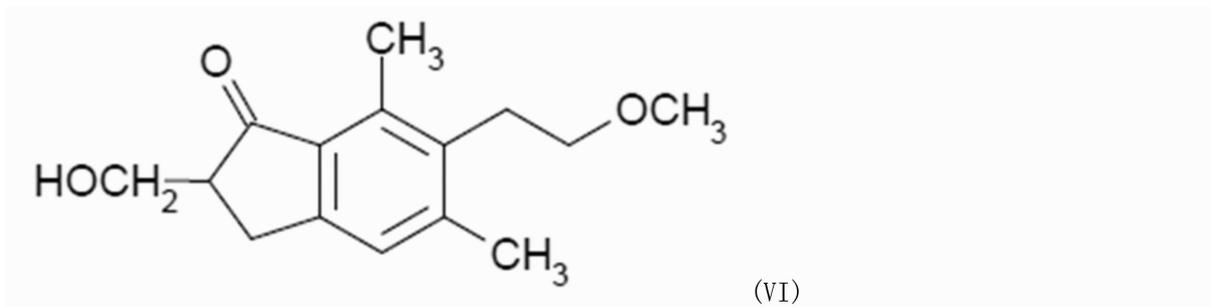


10

で表されるプテロシン Z、
式 (II) における R_1 がヒドロキシメチル基であり、 R_2 が水素であり、 R_9 がメトキシ基である式 (VI)

【0063】

【化 3 3】

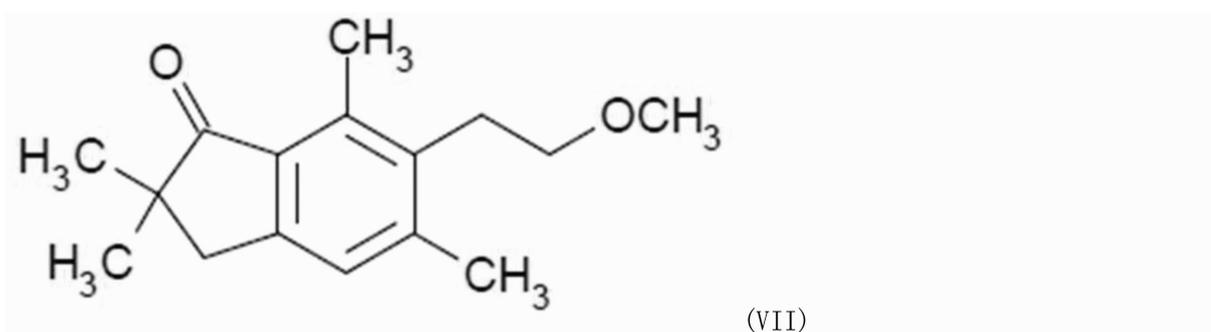


20

で表される 14 - Oメチルプテロシン G、
式 (II) における R_1 がメチル基であり、 R_2 がメチル基であり、 R_9 がメトキシ基である式 (VII)

【0064】

【化 3 4】



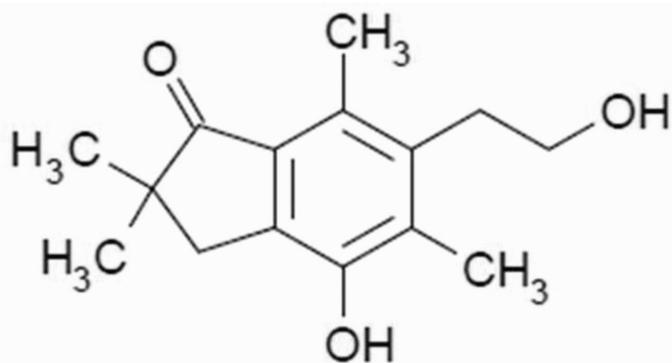
30

で表されるプテロシン I、
式 (III) における R_1 がメチル基であり、 R_2 がメチル基であり、 R_9 がヒドロキシ基である式 (VIII)

【0065】

40

【化 3 5】



(VIII)

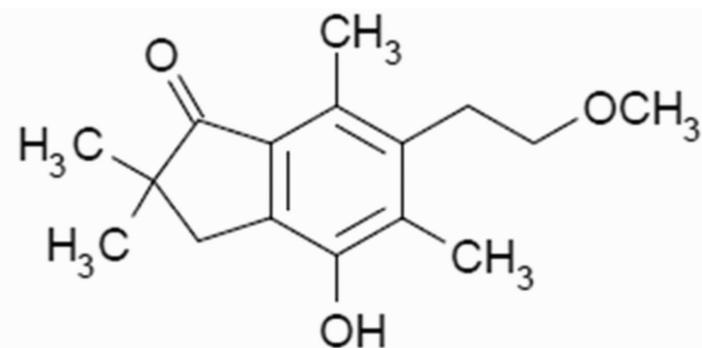
10

で表されるオニチン、

式 (III) における R₁ がメチル基であり、R₂ がメチル基であり、R₉ がメトキシ基である式 (IX)

【 0 0 6 6】

【化 3 6】



(IX)

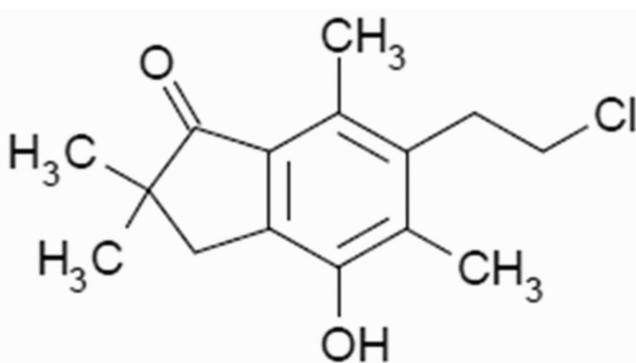
20

で表される 14 - オメチルオニチン、または、

式 (III) における R₁ がメチル基であり、R₂ がメチル基であり、R₉ がメトキシ基である式 (X)

【 0 0 6 7】

【化 3 7】



(X)

40

で表される 14 - デオキシ - 14 - クロロオニチン (または、プテロシン R) である。

【 0 0 6 8】

本発明において、アルキル基とは、別段の記載がない限り、1 ~ 20 の炭素原子 (例: C 1 ~ C 8) を含む直鎖若しくは分岐鎖の一価炭化水素を指す。アルキル基の例には、メチル基、エチル基、n - プロピル基、i - プロピル基、n - ブチル基、i - ブチル基、t - ブチル基が含まれるが、これらに限らない。

本発明において、アルキレン基とは、1 ~ 20 の炭素原子 (例: C 1 ~ C 8) を含む直鎖若しくは分岐鎖の二価炭化水素を指す。アルキレン基の例には、メチレン基及びエチレン基が含まれるが、これらに限らない。

50

【0069】

本発明において、アルケニル基とは、2～20の炭素原子（例：C₂～C₁₀）と1つ以上の二重結合を含む直鎖若しくは分岐鎖の一価または二価の炭化水素を指す。アルケニル基の例には、エテニル基、プロペニル基、プロペニレン基、アリル基、1,4-ブタジエニル基が含まれるが、これらに限らない。

本発明において、アルキニル基とは、2～20の炭素原子（例：C₂～C₁₀）及び1つ以上の三重結合を含む直鎖若しくは分岐鎖の一価または二価の炭化水素を指す。アルキニル基の例には、エチニル基、エチニレン基、1-プロピニル基、1-及び2-ブチニル基及び1-メチル-2-ブチニル基が含まれるが、これらに限らない。

【0070】

本発明において、シクロアルキル基とは、3～30の炭素原子（例：C₃～C₁₂）を有する一価または二価の飽和炭化水素環系を指す。シクロアルキル基の例には、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、1,4-シクロヘキシレン基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基、アダマンチル基が含まれるが、これらに限らない。

本発明において、ヘテロシクロアルキル基とは、1個以上のヘテロ原子（O、N、S、またはSeなど）を有する、一価または二価の非芳香族5～8員単環系、8～12員二環系または11～14員三環系を指す。ヘテロシクロアルキル基の例には、ピペラジニル基、ピロリジニル基、ジオキサニル基、モルフォニル基、テトラヒドロフランニル基が含まれるが、これらに限らない。

【0071】

本発明において、アリール基とは、一価の6-炭素単環式、10-炭素二環式、14-炭素三環式芳香族環系を指す。アリール基の例には、フェニル基、ナフチル基、アントラセニル基が含まれるが、これらに限らない。

本発明において、ヘテロアリール基とは、1個以上のヘテロ原子（O、N、S、またはSeなど）を有する、一価の芳香族5～8員単環系、8～12員二環系、または11～14員三環系を指す。ヘテロアリール基の例には、ピリジル基、フリル基、イミダゾリル基、ベンズイミダゾリル基、ピリミジニル基、チエニル基、キノリニル基、インドリル基、チアゾリル基が含まれる。

【0072】

本発明において、アルコキシ基とは、-O-R基を指し、当該Rが、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、またはヘテロアリール基とすることができる。

本発明において、アルキルチオ基とは、-S-R基を指し、当該Rが、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、またはヘテロアリール基とすることができる。

本発明において、アルキルアミノ基とは、-N-(R)₂基を指し、当該Rが、H、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、またはヘテロアリール基とすることができる。

本発明において、アルコキシカルボニル基とは、-C(O)-O-R基を指し、当該Rが、H、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、またはヘテロアリール基とすることができる。

本発明において、アシルオキシ基とは、-O-C(O)-R基を指し、当該Rが、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、またはヘテロアリール基とすることができる。

【0073】

本発明において、グリコシル基とは、単糖残基で、リボシル、リキソシル、キシロシル、アラビノシル、アロピラノシル、タロピラノシル、グルコピラノシル、アルトロピラノシル、マンノピラノシル、ガラクトピラノシルが例示される。グリコシド結合は糖の立体

10

20

30

40

50

化学のため または 配置を持つことができ、D体であってもL体であってもいずれの異性体であってもよい。

本発明において、グリコシルオキシ基とは、-O-グリコシル基を指し、リボシルオキシ、リキソシルオキシ、キシロシルオキシ、アラビノピラノシルオキシ、アロピラノシルオキシ、タロピラノシルオキシ、グルコピラノシルオキシ、アルトロピラノシルオキシ、マンノピラノシルオキシ、ガラクトピラノシルオキシが例示される。加えて、グリコシド結合は糖の立体化学のため または 配置を持つことができ、いずれの異性体であってもよい。

本発明において、グルコシルオキシアルキル基とは、-R-O-グリコシル基(当該Rは、上記-Rから一つの水素原子を除去して形成される基である。)を指し、グルコピラノシルオキシメチル、グルコピラノシルオキシエチル、グルコピラノシルオキシプロピル等が例示される。グリコシド結合は糖の立体化学のため または 配置を持つことができ、D体であってもL体であってもいずれの異性体であってもよい。

【0074】

別段の記載がない限り、本明細書でいうアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アミノ基、アルキルアミノ基、アルキルチオ基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基は、置換若しくは非置換両方の部分を含む。用語「置換」とは、1つ以上の置換基(同じまたは異なるものとする)を指し、それぞれが水素原子を置換する。置換基の例には、ハロゲン基(例: F、Cl、Br、I)、ヒドロキシル基、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、メルカプト基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アミド基、カルボキシ基、アルカンスルホニル基、アルキルカルボニル基、カルバミド基、カルバミル基、カルボキシル基、チオウレイド基、チオシアナート基、スルホンアミド基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルキルオキシ基、アリール基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基、ヘテロシクリルアルキル基が含まれるが、これらに限らず、そのうち、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルキルオキシ基、アリール基、ヘテロアリール基、ヘテロアリールオキシ基、アルキルアミノ基、アリールアミノ基、オキソ基(O=)、チオキソ基(S=)、チオ基、シリル基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、アシルアミノ基、アミノアシル基、アミノチオアシル基(aminothioacyl)、アミジノ基、チオウレイド基、チオシアナート基、スルホンアミド基、グアニジン基、ウレイド基、アシル基、チオアシル基、カルバミル基(-C(O)NH₂)、カルボキシル基(-COOH)、カルボン酸エステル、そのうちアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルキルオキシカルボニル基、アリール基、ヘテロアリール基、シクリル基、ヘテロシクリル基がさらに置換され得る。またシクロアルキル基、シクロアルケニル基、ヘテロシクロアルキル基、ヘテロシクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアリール基は相互に縮環され得る。置換基は合成の過程において保護基とすることができる。ここで言う「保護基」とは、プロセス工程中に不要な反応をする官能性を保護または遮蔽するために用いられる基または部分を指す。保護基はその工程で反応を防止するが、その後取り除いて本来の官能性を現すことができる。保護基の例には、トリメチルシリル基(TMS)、tert-ブチルオキシカルボニル基(tBoc)、ベンジルオキシカルボニル基(CBZ)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基(Fmoc)が含まれるが、これらに限らない。

【0075】

本発明のプテロシン誘導体は、その化合物自体と、該当する場合、その塩、プロドラッグ、溶媒化合物を含む。例えば塩は、プテロシン化合物上でアニオンと正に荷電した基(例: アミノ基)間で形成され得る。適した塩としては、塩酸塩、臭化水素塩、ヨウ化水素塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、トリフルオロ酢酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、スルホン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、グルタミン酸塩、グルクロン酸塩、乳酸塩、グルタル酸塩、マレイン酸塩が含まれる。同様に、塩はプテロシン化合物上でカチオンと負に荷電した基(例: カルボキシレート基)間でも形成され得る。適し

た塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、およびテトラメチルアンモニウム塩などのアンモニウム塩が含まれる。前記プテロシン化合物はまた、第四窒素原子を含むそれらの塩も含む。前記プロドラッグの例には、エステル及び被験体への投与に際して活性プテロシン化合物を提供できる他、製薬学的に許容される化合物が含まれる。前記溶媒化合物とは、活性プテロシン化合物と製薬学的に許容される溶媒間で形成される複合剤をさす。前記製薬学的に許容される溶媒には水、エタノール、イソプロパノール、酢酸エチル、酢酸、エタノールアミンが含まれる。

【0076】

本発明で用いられるプテロシン誘導体は、天然に存在している化合物、化学合成した化合物または半合成した化合物のいずれを用いてもよい。天然に存在している化合物としては、特に限定されないが、例えば、コバノイシカグマ科またはイノモトソウ科などのワラビから抽出した化合物などが挙げられる。ワラビから目的の化合物を抽出する方法は、公知方法、自体公知の方法、またはそれらに準じた方法に従って行ってよい（例えば、Yoshihira, K et al, Chem. Pharm. Bull., 19, 1491-1495 (1971)を参照。）。半合成した化合物としては、特に限定されないが、例えば、ワラビ抽出物として知られるプタキロシドを脱糖鎖化し、所望の置換基を付加させた化合物、あるいは、インデンに所望の置換基を付加させた化合物などが挙げられる。置換基の付加は、公知方法、自体公知の方法、またはそれらに準じた方法に従って行ってよい。また、例えば、Mohamed A, et al, Molecules, 17, 5795-5802 (2012)に示されるような合成方法によっても、本発明に用いられるプテロシン誘導体を得ることができる。

【0077】

本発明のプテロシン誘導体をそのまま単独で、または薬理的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等と混合し、適当な剤型の医薬組成物として経口的又は注射剤等の非経口的に投与することができる。好ましくは、関節腔内への注射による直接投与である。

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。一方、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は関節腔内注射剤等の剤形を包含しても良い。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；磷酸水素カルシウムのような磷酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤である）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ピーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体である）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物である）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプンおよび/または化学修飾されたセルロース類である）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂

肪酸エステル、シヨ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤である)、安定剤(メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類;クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類;塩化ベンザルコニウム;フェノール、クレゾールのようなフェノール類;チメロサール;デヒドロ酢酸;及び、ソルビン酸である)、矯味矯臭剤(例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等である)、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

【0078】

この他にも、例えば、コアセルベーション法、溶融押出法、噴霧乾燥法および溶媒蒸発法などにより徐放性マイクロスフェアを形成して、製剤化が行われても良い。これらのマイクロスフェアの製造方法のうち、二重エマルジョン(W/O/W;水/油/水型)と単一エマルジョン(O/W;油/水型)が挙げられる。プテロシン誘導体のマイクロスフェアへの封入は、プテロシン誘導体を含む水層と油層を混合することで行われてもよく(例えば、特許第3765338に記載の方法)、ゼラチン、寒天、アルギン酸ナトリウム、ポリビニールアルコールあるいは塩基性アミノ酸(例えば、アルギニン、ヒスチジン、リジンなど)を含む水層と油層を混合した後に、プテロシン誘導体溶液と接触させることで取り込ませても良い(例えば、特開2005-206491に記載の方法)。

10

【0079】

本発明におけるプテロシン誘導体の投与量は、患者の症状、年齢、体重等の種々の条件により変化し得るが、関節腔内投与の場合には、1回当たり下限0.01mg(好適には0.05mg)、上限100mg(好適には50mg)を、成人に対して1回以上投与することができる。症状に応じて増量もしくは減量してもよい。

20

【0080】

さらに、本発明のプテロシン誘導体は、自家軟骨移植や幹細胞由来の軟骨細胞移植等と組み合わせて用いてもよい。

【0081】

本発明の他の態様には、上記プテロシン誘導体を含む、軟骨欠損、軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患の治療用の機能性食品が含まれる。このような機能性食品は、特に、変形関節症の治療用の機能性食品として提供される。また、プテロシン誘導体は、コバノイシカグマ科またはイノモトソウ科などのワラビ、トクサ科のスギナ、またはタカワラビ科のタカワラビからの抽出液またはそれを乾燥させた粉末に由来してもよい。

30

【0082】

なお、本発明において用いるプテロシン誘導体の具体例を表1に示す。

【0083】

【表 1】

表1

化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
1	CH ₃	CH ₂ OH	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
2	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
3	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
4	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ COOH	CH ₃
5	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Cl	CH ₃
6	H	CH ₂ OH	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
7	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Cl	CH ₃
8	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₃
9	CH ₃	CH ₂ OH	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Cl	CH ₃
10	CH ₃	OH	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
11	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₃
12	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₃
13	CH ₃	H	H	H	H	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
14	CH ₃	CH ₃	H	H	OH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Cl	CH ₃
15	CH ₂ OH	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₃
16	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
17	CH ₃	CH ₂ OH	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
18	CH ₃	CH ₂ OH	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
19	CH ₃	CH ₂ Oglu	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
20	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
21	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
22	CH ₃	H	H	Oglu	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
23	CH ₃	H	Oglu	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
24	CH ₃	CH ₃	H	Oglu	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
25	CH ₃	CH ₃	H	Oara	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Cl	CH ₃

10

20

30

【 0 0 8 4 】

【表 2】

表1の続き

化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
26	CH ₃	CH ₂ Oglu	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
27	CH ₃	CH ₂ OH	H	Oara	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	H
28	H	CH ₃	H	Oglu	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
29	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₃
30	CH ₃	H	H	H	H	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
31	CH ₃	H	H	H	OH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
32	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
33	CH ₃	CH ₃	H	Oara	H	CH ₃	CHOHCH ₂ OH	CH ₃
34	CH ₃	CH ₃	H	H	Oglu	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
35	CH ₃	H	CH ₃	Oglu	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
36	CH ₃	H	H	H	OH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
37	CH ₃	CH ₂ OH	H	H	OH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
38	CH ₃	H	H	H	H	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H
39	CH ₃	OH	H	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
40	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ Oglu	CH ₃
41	CH ₃	CH ₃	H	4cou-glu	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
42	CH ₃	CH ₃	3glu	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
43	CH ₃	CH ₃	6cou-glu	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
44	H	H	H	H	H	CH ₃	Br	CH ₃
45	COOC ₂ H ₅	H	H	H	H	CH ₃	Br	CH ₃
46	COOC ₂ H ₅	CH ₃	H	H	H	CH ₃	Br	CH ₃
47	COOC ₂ H ₅	CH ₃	H	H	H	CH ₃	C=CH ₂	CH ₃
48	CH ₂ OTES	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ TIPSO	CH ₃
49	H	CH ₂ OH	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₃
50	CH ₃	CH ₃	H	H	OH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
51	CH ₃	CH ₃	H	H	OH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₃

【0085】

なお、表中、gluはグルコース、araはアラビノース、4cou-gluは4-O-p-クマロイル-D-グルコース、3gluは3-O-D-グルコピラノシド、6cou-gluは6-O-p-クマロイル-D-グルコース、TESはトリエチルシリル基、TIPSOはトリイソプロピルシリルオキシ基を意味する。

【0086】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【実施例】

【0087】

[実施例1]

<Pterosin B>

Pterosin Bは、ワラビより抽出したPterosin(プテロシン)B(以下、抽出Pterosin Bと称す)(医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センターより入手可能)、および合成され

10

20

30

40

50

たPterodin B (以下、合成Pterodin Bと称す) (株式会社インテリムより入手可能) を用いた。

【0088】

<マウス軟骨細胞における抽出Pterodin Bの効果>

生後1-5日目のマウスの大腿骨遠位骨端軟骨および脛骨近位骨端軟骨より得られた初代軟骨細胞を遠心機を用いてペレット状とし、10%ウシ胎児血清を含むDMEM中へ抽出Pterodin Bを各濃度(0 μ M(基剤のDMSOのみ)、100 μ M、200 μ Mおよび300 μ M)添加した。抽出Pterodin Bの添加後28日目に、細胞ペレットを回収し、サフラニンO染色を行ったところ、抽出Pterodin Bの濃度依存的に染色が強くなることが確認された(図1A)。さらに、細胞ペレットを定量RT-PCRを用いてCol2a1、Col10a1およびSik3のGapdhに対する相対的mRNA量を測定したところ、Col2a1のmRNA量は、抽出Pterodin Bの濃度依存的に多くなり、Col10a1は、抽出Pterodin Bの濃度依存的に少なくなった(図1B)。なお、Col2a1は骨芽細胞(骨組織において骨形成を行う細胞)関連遺伝子であり、Col10a1は軟骨細胞が肥大軟骨細胞へ変化したことを示唆する遺伝子である。

10

【0089】

<マウス胎児中足骨の成長に与えるPterodin Bの効果>

E15.5のマウス胎児より中足骨を単離し、10%ウシ胎児血清を含むDMEM中で組織培養を行った。この培養液中へ300 μ Mの抽出Pterodin Bまたは合成Pterodin Bを添加して培養し、7日後、中足骨を回収して組織切片を作製した。回収する8時間前にBrdUを培養液に添加した。得られた中足骨の組織切片をサフラニンO染色および抗BrdU抗体を用いた免疫染色を行ったところ、抽出Pterodin Bまたは合成Pterodin Bを添加した場合において、広範囲にサフラニンOで染色され、BrdU陽性の細胞数が増加したことが確認された(図2および図3)。また、抽出Pterodin Bまたは合成Pterodin Bを添加した場合において、肥大軟骨細胞の細胞数が減少していた(図4)。以上より、抽出Pterodin Bまたは合成Pterodin Bは同等の効果をも有し、軟骨細胞の増殖効果および軟骨細胞の肥大化を抑制する効果をも有することが確認された。

20

【0090】

<ヒト軟骨細胞におけるPterodin Bの効果>

内側型特発性骨壊死の68歳女性より同意のもと採取された軟骨細胞を7日間、10%ウシ胎児血清を含むDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium、ダルベッコ改変イーグル培地)で培養した後(3日後の写真を図5Aに示す)、遠心機を用いてペレット状とした(図5A)。得られたヒト軟骨細胞ペレットを10%ウシ胎児血清および300 μ M抽出Pterodin Bを含むDMEMで14日間または28日間培養後、細胞ペレットを回収し、サフラニンO染色を行ったところ、抽出Pterodin Bを添加した場合において、14日後から染色が強くなることが確認された(図5B)。さらに、細胞ペレットを定量RT-PCRを用いてCOL2A1、COL11A2、ACAN、SOX9、COL10A1およびCOL1A1のGAPDHに対する相対的mRNA量を測定したところ、COL2A1、COL11A2、ACANおよびSOX9のmRNA量は、合成Pterodin Bの添加により多くなり、COL10A1およびCOL1A1は、抽出Pterodin Bの添加により少なくなった(図6)。以上より、Pterodin Bによりヒト軟骨細胞よりCOL2A1などの軟骨基質が増加し、軟骨細胞の肥大化が減少することが示された。従って、ヒトにおいても硝子軟骨を増加させる効果をも有することが示唆された。

30

40

【0091】

<in vivoでのPterodin Bの効果>

8週齢の雄C57BL/6マウスへ表4に示した例にて、300 μ Mまたは900 μ Mの抽出Pterodin Bもしくは基剤(PBSおよびDMSOの混合溶液)を左側の膝関節腔の外側に3回/週にて投与した。

【0092】

【表 3】

No	左	右	大腿骨内側上顆所見
1	PBS-DMSO	未処置	軽度軟骨欠損
2	PBS-DMSO	未処置	軽度軟骨欠損
3	PBS-DMSO	未処置	異常なし
4	300 μ M	未処置	異常なし
5	300 μ M	未処置	中度骨関節炎
6	300 μ M	未処置	異常なし
7	300 μ M	未処置	異常なし
8	900 μ M	未処置	異常なし
9	900 μ M	未処置	異常なし
10	900 μ M	未処置	中度骨関節炎および軟骨腫
11	900 μ M	未処置	異常なし

10

【0093】

投与4週後、膝関節を取り出し、サフラニン0-ファーストグリーン アイアンヘマトキシリンで染色後、図7Aに記載した骨方向を基準として、90度の範囲の大腿骨内側上顆の関節軟骨領域をコンピューターを用いて計測した。代表的な所見を図7Bに示す。軟骨の領域を測定した結果、Pterosin Bの濃度依存的に軟骨領域が増加することが確認された(図7C)。その他の所見については、表1に示す。以上より、膝関節腔に投与することで *in vivo*においてもPterosin Bにより軟骨増大効果を有することが示された。

20

【0094】

[実施例2]

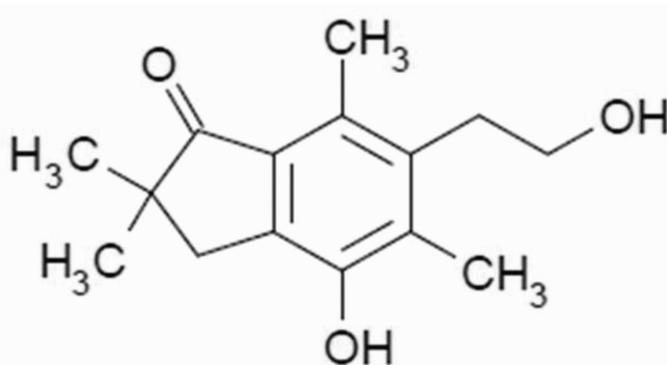
<Pterosin誘導体>

Onitin (オニチン) (1)、14-O-Methylonitin (14-O-メチルオニチン) (2)、14-deoxy-14-chloroonitin (14-デオキシ-14-クロロオニチン、Pterosin R) (3)、14-O-Methylpterosin (14-O-メチルプテロシン) G (4)、Pterosin Z、Pterosin I (5)は、ワラビより抽出した(医薬基盤研 薬用植物資源研究センターより入手可能)。各化合物の構造式は以下に示す。

30

【0095】

【化38】

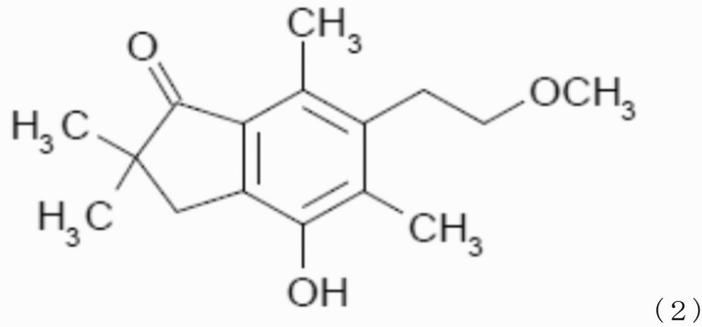


(1)

40

【0096】

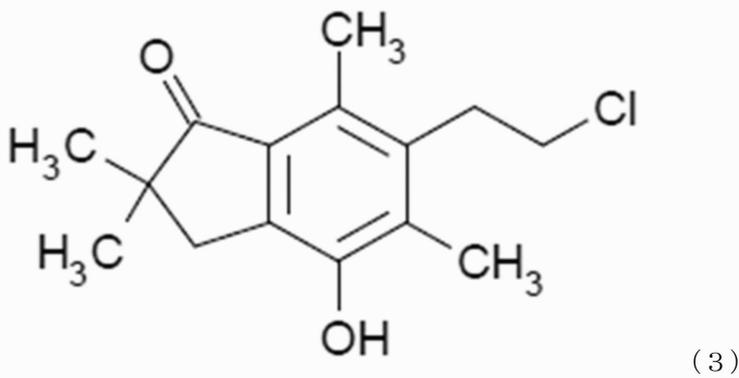
【化39】



10

【0097】

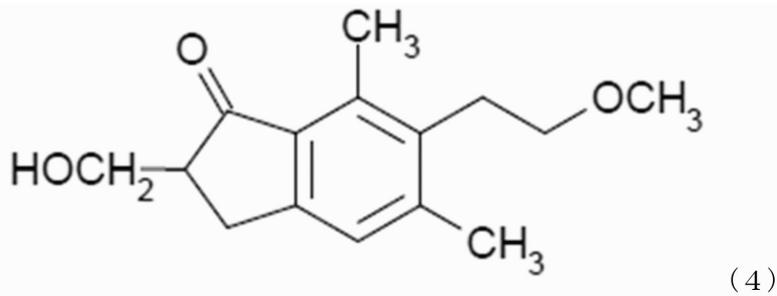
【化40】



20

【0098】

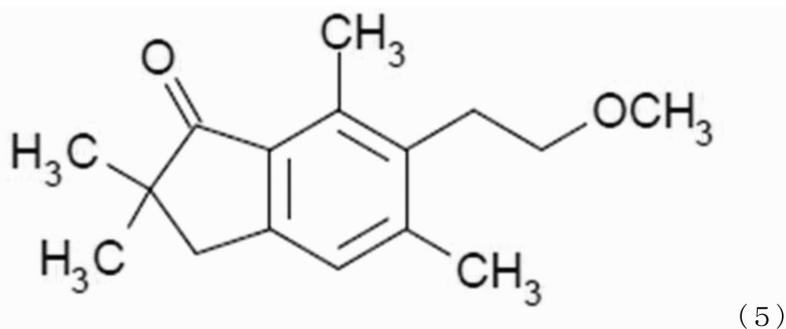
【化41】



30

【0099】

【化42】



40

【0100】

< Pterosin誘導体のSIK3抑制活性の測定 >

SIK3シグナルに対する阻害作用を、SIK3が抑制する転写共役因子CRTC2 (転写因子CREBの共役因子で、TORC2とも称す) 活性誘導で関連検討をPCT/JP2012/063709の方法に従って行った。Pterosin Bが僅かにSIK3を抑制できる濃度150 μMにおいてPterosin Bよりも活性の高い類似体 (Onitin、14-O-Methyl-Onitin、14-Chloro-Onitin、14-O-Methyl-Pterosin G、Pterosin ZおよびPterosin I) が見出された(図8)。

50

以上の結果より、Onitin、14-O-Methyl-Onitin、14-Chloro-Onitin、14-O-Methyl-Pterosin G、Pterosin ZおよびPterosin Iも、Pterosin Bと同様に軟骨の増殖効果を有する可能性が高いことが示唆された。

【 0 1 0 1 】

<Pterosin誘導体の軟骨形成への影響>

実施例 1 と同様に、生後 1 - 5 日目のマウスより得られた初代軟骨細胞のペレットを 10% ウシ胎児血清を含む DMEM 中へ各 Pterosin 誘導体（合成 Pterosin B および Pterosin Z）を 300 μM を添加した。添加後 2 週目および 4 週目に、細胞ペレットを回収し、定量 RT-PCR を用いて Col10a1 の Gapdh に対する相対的 mRNA 量を測定したところ、Col10a1 が、合成 Pterosin B および Pterosin Z の添加により減少することが確認された（図 9）。

10

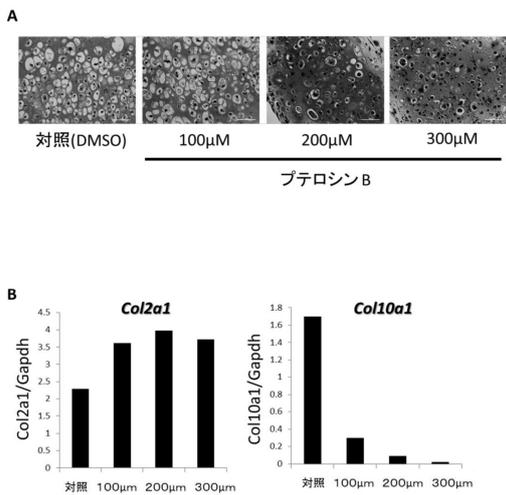
以上の結果より、Pterosin Z も、Pterosin B と同様に軟骨細胞の肥大化を抑制する効果を有することが示された。

【産業上の利用可能性】

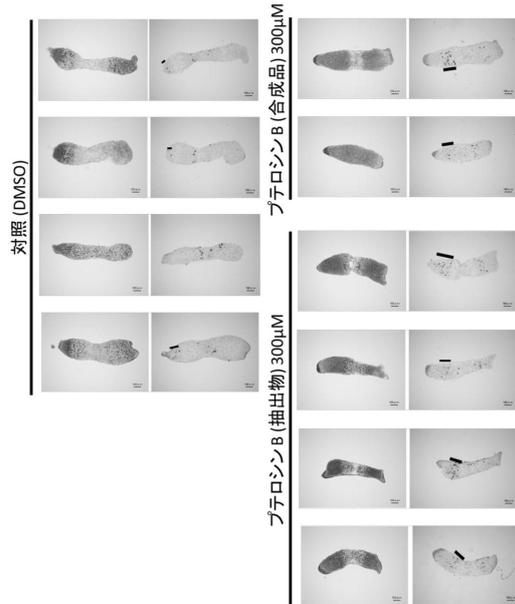
【 0 1 0 2 】

本発明では、軟骨欠損、軟骨変性、および / または軟骨菲薄疾患を治療できる。

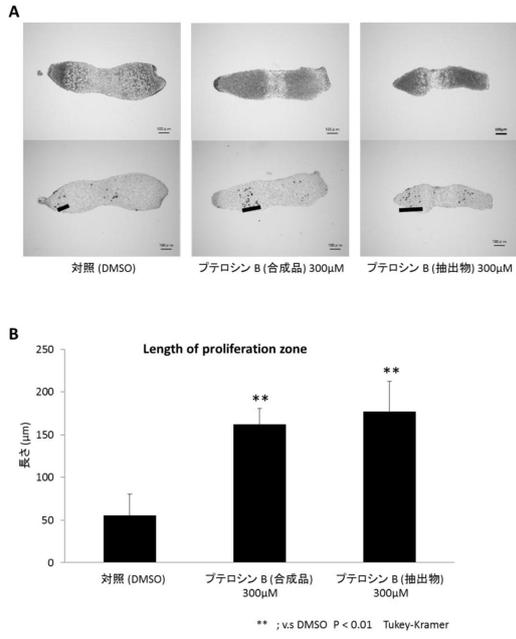
【 図 1 】



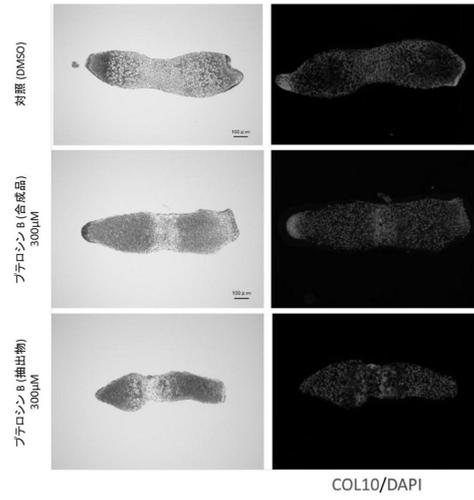
【 図 2 】



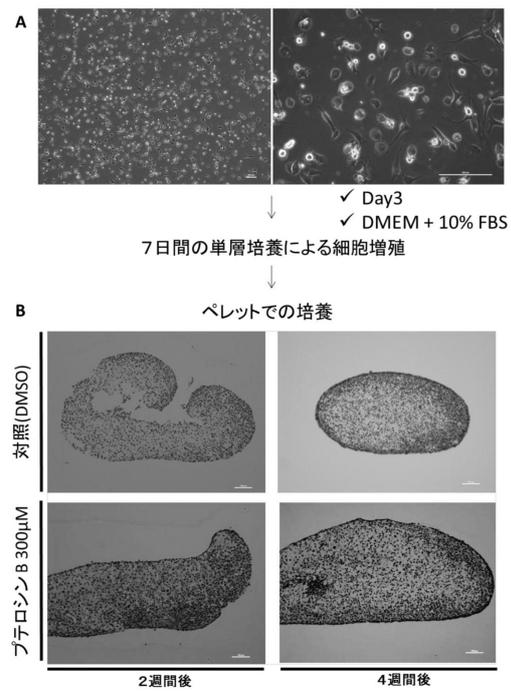
【 図 3 】



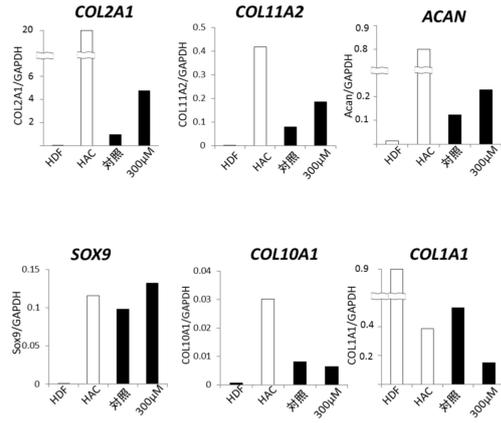
【 図 4 】



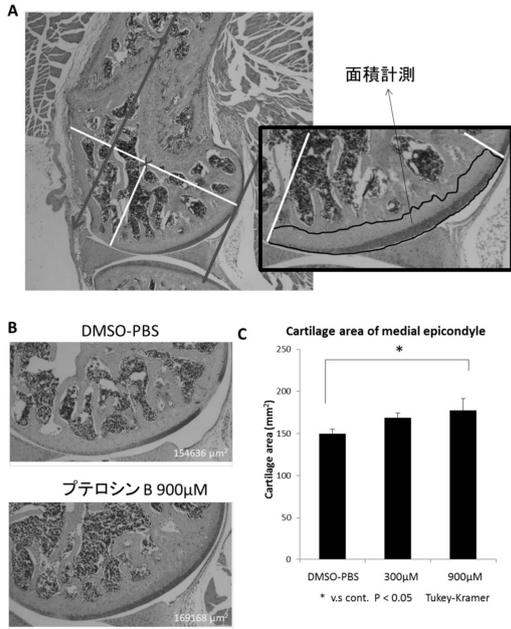
【 図 5 】



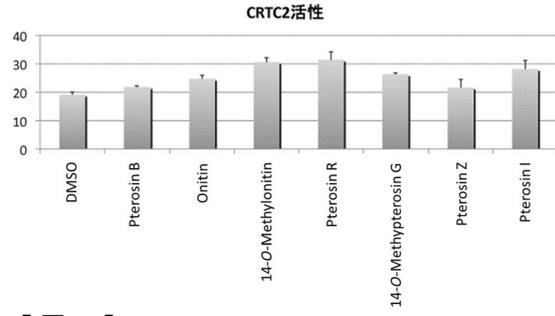
【 図 6 】



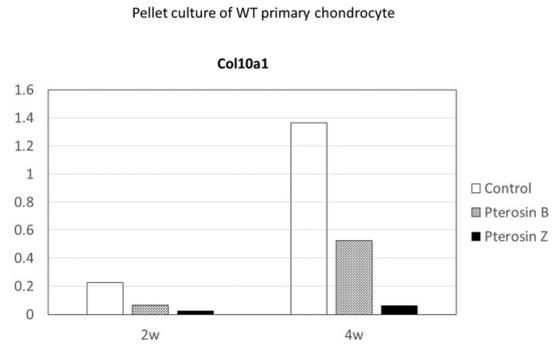
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(72)発明者 瀧野 裕之
茨城県つくば市八幡台1 - 2番 独立行政法人医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波
研究部内

(72)発明者 川原 信夫
茨城県つくば市八幡台1 - 2番 独立行政法人医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波
研究部内

審査官 鈴木 理文

(56)参考文献 特表2005 - 531581 (JP, A)
特開2006 - 063064 (JP, A)
特表2007 - 537233 (JP, A)
米国特許第06649606 (US, B1)
特表2008 - 525498 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/122

A61P 19/00

A61P 19/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)