

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/086334

発行日 平成17年8月18日(2005.8.18)

(43) 国際公開日 平成15年10月23日(2003.10.23)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 K 7/00  
 A 6 1 K 7/06  
 A 6 1 K 31/365  
 A 6 1 P 17/14

F I

A 6 1 K 45/00 Z N A  
 A 6 1 K 7/00 D  
 A 6 1 K 7/06  
 A 6 1 K 31/365  
 A 6 1 P 17/14

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 97 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-583359 (P2003-583359)	(71) 出願人	000002819 大正製薬株式会社 東京都豊島区高田3丁目24番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2003/004884	(74) 代理人	100099195 弁理士 宮越 典明
(22) 国際出願日	平成15年4月17日(2003.4.17)	(72) 発明者	池田 明子 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2002-115529 (P2002-115529)	(72) 発明者	篠永 英樹 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内
(32) 優先日	平成14年4月17日(2002.4.17)	(72) 発明者	藤本 奈津子 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, B A, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, M W, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 育毛剤

(57) 【要約】

W N T - 5 A の機能阻害活性を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤、発毛剤及び育毛剤。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

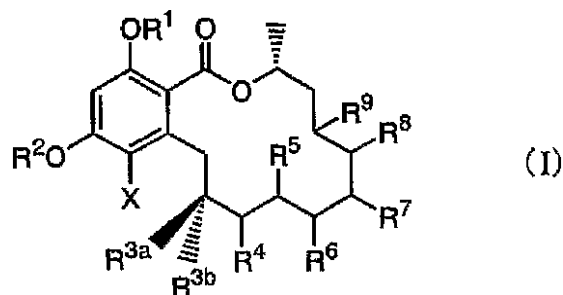
WNT-5A の機能阻害活性を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤。

## 【請求項 2】

WNT-5A の機能を阻害する化合物が WNT-5A 産生抑制剤である、請求項 1 に記載の毛乳頭細胞増殖促進剤。

## 【請求項 3】

式 (I)



10

(式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は同一又は異なって水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基又は  $C_{2-6}$  アルカノイル基を示し、

X は水素原子又はハロゲン原子を示し、

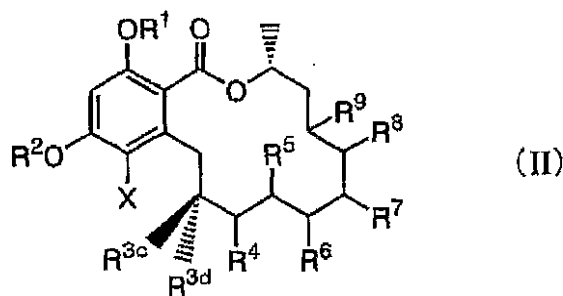
$R^{3a}$  及び  $R^{3b}$  は異なって水素原子又は水酸基を示し、

$R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$  及び  $R^9$  は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、 $C_{2-6}$  アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、あるいは  $R^5$  と  $R^8$  若しくは  $R^5$  と  $R^9$  が一緒になってエーテル結合を形成する。) で表される化合物。

20

## 【請求項 4】

式 (II)



30

(式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は同一又は異なって水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基又は  $C_{2-6}$  アルカノイル基を示し、X は水素原子又はハロゲン原子を示し、

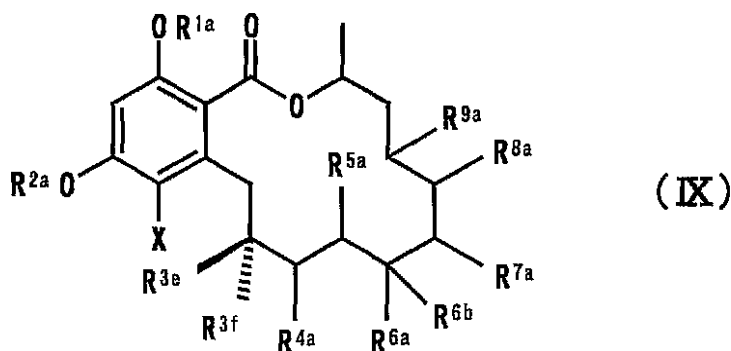
$R^{3c}$  及び  $R^{3d}$  は同一又は異なって水素原子、水酸基又は  $C_{1-6}$  アルコキシ基を示すか、あるいは  $R^{3c}$  及び  $R^{3d}$  が一緒になってオキシ基、ヒドロキシイミノ基又は  $C_{1-6}$  アルコキシイミノ基を形成し、

$R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$  及び  $R^9$  は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、 $C_{2-6}$  アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、あるいは  $R^5$  と  $R^8$  若しくは  $R^5$  と  $R^9$  が一緒になってエーテル結合を形成する。) で表される化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤。

40

## 【請求項 5】

式 (IX)



[ 式中、 $R^{1a}$  及び  $R^{2a}$  は同一又は異なって水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基、 $C_{1-6}$  アルカノイル基、

$(CH_2)_p CO - Y - R^{10}$  ( 式中、 $Y$  は酸素原子又は硫黄原子を示し、 $R^{10}$  は水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基又は置換若しくは無置換のアリール基を示し、 $p$  は 0 又は 1 を示す。 ) で表される基、

$(CH_2)_q R^{11}$  ( 式中、 $R^{11}$  は置換若しくは無置換のシクロアルキル基又は置換若しくは無置換の  $C_{2-10}$  ヘテロ環を示し、 $q$  は 0 又は 1 を示す。 ) で表される基、又は  $CO R^{12}$  ( 式中、 $R^{12}$  は置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換の  $C_{2-10}$  ヘテロ環を示す。 ) で表される基を示し、 $X$  は水素原子又はハロゲン原子を示し、

$R^{3e}$  及び  $R^{3f}$  は同一又は異なって水素原子、水酸基、 $C_{1-6}$  アルコキシ基又は  $C_{1-6}$  アルカノイルオキシ基を示すか、又は  $R^{3e}$  及び  $R^{3f}$  が一緒になってオキシ基、ヒドロキシイミノ基又は  $C_{1-6}$  アルコキシイミノ基を形成し、 $R^{4a}$ 、 $R^{5a}$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{8a}$  及び  $R^{9a}$  は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子又は  $Z - R^{13}$  ( 式中、 $Z$  は酸素原子又は硫黄原子を示し、 $R^{13}$  は  $C_{1-6}$  アルキル基、 $C_{1-6}$  アルカノイル基又は置換若しくは無置換のアリール基を示す。 ) で表される基を示すか、

又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、

あるいは  $R^{5a}$  と  $R^{8a}$  若しくは  $R^{5a}$  と  $R^{9a}$  が一緒になってエーテル結合を形成し、 $R^{6b}$  は水素原子を示すか、あるいは  $R^{3e}$  若しくは  $R^{3f}$  と一緒になってエーテル結合を形成する。 ] で表される化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤。

#### 【請求項 6】

請求項 1、2、4 又は 5 に記載の毛乳頭細胞増殖促進剤を有効成分とする発毛剤又は育毛剤。

#### 【請求項 7】

薬学的に有効量の WNT - 5 A の機能阻害活性を有する化合物をヒトに投与することを特徴とする、発毛又は育毛方法。

#### 【請求項 8】

発毛剤又は育毛剤の製造における、WNT - 5 A の機能阻害活性を有する化合物の使用。

#### 【請求項 9】

WNT - 5 A の機能を阻害する化合物を選択することを特徴とする、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

#### 【請求項 10】

下記 ( a ) ~ ( c ) の工程を含むことを特徴とする請求項 9 記載の方法。

( a ) ヒト WNT - 5 A 発現細胞を化合物を添加した培地を用いて培養する工程；

( b ) 工程 ( a ) で培養したヒト WNT - 5 A 発現細胞を溶解して RNA を抽出し、WNT - 5 A mRNA 量を測定する工程；及び

( c ) 工程 ( b ) で測定した WNT - 5 A mRNA 量を比較する工程。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 技術分野

本発明は、毛乳頭細胞増殖促進剤、発毛剤及び育毛剤に関するものである。具体的には、

WNT-5Aの機能阻害物質を有効成分とする毛乳頭細胞増殖促進剤、発毛剤及び育毛剤に関するものである。また、WNT-5A機能阻害作用に基づく毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法に関するものである。

#### 背景技術

ヒト毛髪毛包は、角化細胞、毛乳頭細胞、繊維芽細胞及び脂腺細胞等の様々な上皮系及び真皮間様系の細胞から構成されており、これらの細胞間相互作用を介して、毛髪の成長サイクル(毛周期)が調節されている。毛の本体は、毛包角化細胞の増殖/分化(角化)により形成されるが、この毛包角化細胞の増殖、分化及びアポトーシスを制御し、毛周期調節の中心的な役割を担っているのは、毛乳頭である。したがって、発毛剤/育毛剤を開発する上で毛乳頭細胞に対する作用を研究することは重要と考えられる。しかし、これまで

10

一方、WNT-5Aは、WNTファミリーに属する分泌性糖蛋白質である。WNTファミリーには、約20種類の分子が存在し、各分子は線虫から哺乳類まで広く保存されている。これらWNTsは、胎生期の体軸形成や器官形成を制御する重要な細胞間シグナル分子であることが知られている(Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88(1998)、Genes & Dev. 11, 3286-3305(1997))。WNTsの受容体は、7回膜貫通型のFrizzledで、ヒトでは10種類存在する(Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88(1998)、Genes & Dev. 11, 3286-3305(1997))。WNTとFrizzledの結合の組み合わせに依存して、3種類のシグナル伝達経路(WNT/-カ

20

テニン経路、PCP経路、WNT/Ca<sup>2+</sup>経路)が存在する(Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88(1998))。近年、WNT/-カテニン経路が毛包形成に重要であることが明らかにされた(Genes & Dev. 8, 2691-2703(1994)、Cell 95, 605-614(1998)、Dev. Biol. 207, 133-149(1999)、Genes & Dev. 14, 1181-1185(2000)、Cell 105, 533-545(2001))。1998年には、安定化/-カテニンの皮膚におけるトランスジェニックマウスが作製され、このマウスは毛包新生が亢進し多毛となることが報告された(Cell 95, 605-614(1998))。また、2000年には、毛乳頭細胞

30

の毛包誘導能の維持に、WNT/-カテニンシグナルが重要であることが報告された(Genes & Dev. 14, 1181-1185(2000))。しかし、WNT-5Aからのシグナル伝達は、/-カテニン経路ではなく、Ca<sup>2+</sup>経路を介することが明らかにされており(Dev. Biol. 182, 114-120(1997)、Curr. Biol. 9, 695-698(1999))、WNT-5Aと毛包新生との関連性については何ら報告はない。

この他、アフリカツメガエルWNT-5A mRNAをヒトFrizzled5 mRNAとともにアフリカツメガエル初期胚に注入すると二次体軸が誘導する(Science 275, 1652-1654(1997))一方、WNT-1やWNT-8 mRNAの注入により誘導される二次体軸形成をWNT-5Aが抑制するという報告(J. Cell Biol. 133, 1123-1137(1996))や、アフリカツメガエルWNT-5Aは、ラットFrizzled2と結合し、Ca<sup>2+</sup>経路を介してCamKII(Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II)とPKC(protein kinase II)が活性化されるなどの報告(Curr. Biol. 9, 695-698(1999))があるが、生理的な意味は未だ解明されておらず、WNT-5Aと発毛/育毛との関連性についても何ら報告はない。

40

#### 発明の開示

本発明は、毛乳頭細胞の増殖を制御する分子を用いたスクリーニング方法、毛乳頭細胞増殖促進剤並びに新規な作用に基づく発毛剤又は育毛剤を提供することを目的とする。

本発明者らは上記目的のため鋭意研究を行った結果、毛乳頭細胞にWNT-5Aが高発現

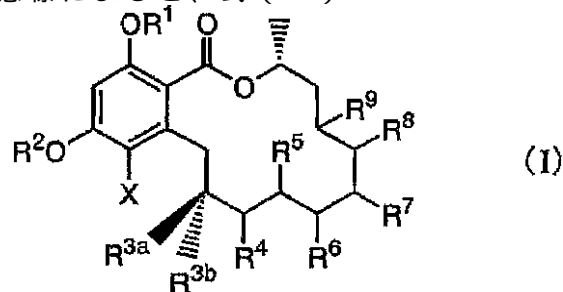
50

していること、WNT-5Aが毛乳頭細胞の増殖能に關与することを発見した。さらにこの知見に基づき検討を重ねた結果、WNT-5Aの機能を阻害することにより毛乳頭細胞の増殖を顕著に促進し、毛包の毛球部位を増大することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の1態様によると、WNT-5Aの機能阻害活性を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤を提供する。

また、本発明の他の態様によると、WNT-5A産生抑制作用を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤を提供する。

また、本発明の他の態様によると、式(I)



10

[式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は同一又は異なって水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基又は  $C_{2-6}$  アルカノイル基を示し、

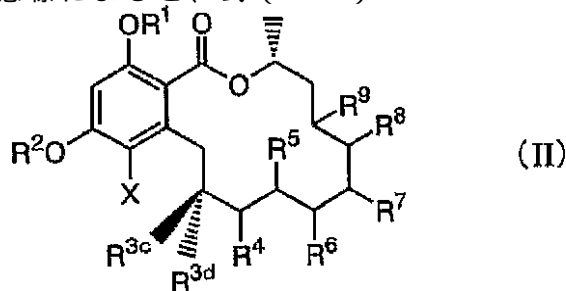
X は水素原子又はハロゲン原子を示し、

$R^{3a}$  及び  $R^{3b}$  は異なって水素原子又は水酸基を示し、

$R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$  及び  $R^9$  は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子又は  $C_{2-6}$  アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、あるいは  $R^5$  と  $R^8$  若しくは  $R^5$  と  $R^9$  が一緒になってエーテル結合を形成する。]で表される化合物を提供する。

20

また、本発明の他の態様によると、式(II)



30

[式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は同一又は異なって水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基又は  $C_{2-6}$  アルカノイル基を示し、

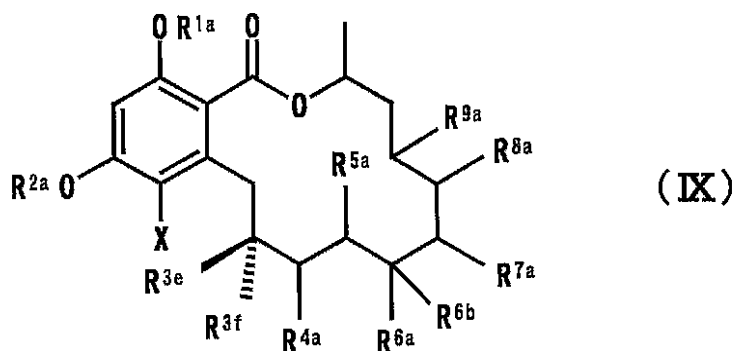
X は水素原子又はハロゲン原子を示し、

$R^{3c}$  及び  $R^{3d}$  は同一又は異なって水素原子、水酸基又は  $C_{1-6}$  アルコキシ基を示すか、あるいは  $R^{3c}$  と  $R^{3d}$  が一緒になってオキシ基、ヒドロキシイミノ基又は  $C_{1-6}$  アルコキシイミノ基を形成し、

$R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$  及び  $R^9$  は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子又は  $C_{2-6}$  アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、あるいは  $R^5$  と  $R^8$  若しくは  $R^5$  と  $R^9$  が一緒になってエーテル結合を形成する。]で表される化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤を提供する。

40

また、本発明の他の態様によると、式(IX)



[ 式中、 $R^{1a}$  及び  $R^{2a}$  は同一又は異なって水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基、 $C_{1-6}$  アルカノイル基、

$(CH_2)_p CO - Y - R^{10}$  ( 式中、 $Y$  は酸素原子又は硫黄原子を示し、 $R^{10}$  は水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基又は置換若しくは無置換のアリール基を示し、 $p$  は 0 又は 1 を示す。 ) で表される基、

$(CH_2)_q R^{11}$  ( 式中、 $R^{11}$  は置換若しくは無置換のシクロアルキル基又は置換若しくは無置換の  $C_{2-10}$  ヘテロ環を示し、 $q$  は 0 又は 1 を示す。 ) で表される基、又は  $CO R^{12}$  ( 式中、 $R^{12}$  は置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換の  $C_{2-10}$  ヘテロ環を示す。 ) で表される基を示し、 $X$  は水素原子又はハロゲン原子を示し、

$R^{3e}$  及び  $R^{3f}$  は同一又は異なって水素原子、水酸基、 $C_{1-6}$  アルコキシ基又は  $C_{1-6}$  アルカノイルオキシ基を示すか、又は  $R^{3e}$  と  $R^{3f}$  が一緒になってオキソ基、ヒドロキシイミノ基又は  $C_{1-6}$  アルコキシイミノ基を形成し、

$R^{4a}$ 、 $R^{5a}$ 、 $R^{6a}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{8a}$  及び  $R^{9a}$  は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子又は

$Z - R^{13}$  ( 式中、 $Z$  は酸素原子又は硫黄原子を示し、 $R^{13}$  は  $C_{1-6}$  アルキル基、 $C_{1-6}$  アルカノイル基又は置換若しくは無置換のアリール基を示す。 ) で表される基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、あるいは  $R^{5a}$  と  $R^{8a}$  若しくは  $R^{5a}$  と  $R^{9a}$  が一緒になってエーテル結合を形成し、

$R^{6b}$  は水素原子を示すか、あるいは  $R^{3e}$  若しくは  $R^{3f}$  と一緒になってエーテル結合を形成する。 ] で表される化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤を提供する。

また、本発明の他の態様によると、上記毛乳頭細胞増殖促進剤を有効成分とする発毛剤又は育毛剤を提供する。

また、本発明の他の態様によると、WNT - 5 A の機能を阻害する物質を選択することを特徴とする、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法を提供する。また、本発明は、WNT - 5 A の機能を阻害する物質を選択する方法であって、下記 ( a ) ~ ( c ) の工程を含むことを特徴とする毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法である。

( a ) ヒト WNT - 5 A 発現細胞を被検化合物を添加した培地を用いて培養する工程：

( b ) 工程 ( a ) で培養したヒト WNT - 5 A 発現細胞を溶解して RNA を抽出し、WNT - 5 A mRNA 量を測定する工程：及び

( c ) 工程 ( b ) で測定した WNT - 5 A mRNA 量を比較する工程。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明を更に具体的に説明する。

< WNT - 5 A の機能を阻害する化合物 >

本発明において「WNT - 5 A の機能を阻害する化合物」( 以下、「WNT - 5 A 機能阻害剤」ということがある。 ) とは、WNT - 5 A と WNT - 5 A 受容体の結合を阻害する化合物、又は、WNT - 5 A の産生を抑制する化合物を意味し、好ましくは WNT - 5 A の産生を抑制する化合物である。

WNT - 5 A は、ヒト、マウス、ラット、アフリカツメガエル等でその発現が確認されている WNT ファミリーに属する分泌性糖蛋白質であるが、医薬品として使用する点からヒトの WNT - 5 A ( 配列番号 1 ) 機能を阻害する化合物が好ましい。

10

20

30

40

50

WNT-5AとWNT-5A受容体の結合を阻害する化合物とは、WNT-5A又はWNT-5A受容体に作用することによりWNT-5AとWNT-5A受容体の結合を阻害し、WNT-5Aによるシグナル伝達を抑制するものを意味し、好ましくはCa<sup>2+</sup>経路を介したシグナル伝達を抑制する化合物であり、例えば、WNT-5A受容体アンタゴニストを挙げることができる。WNT-5A受容体としては、具体的には例えば、ヒトFrizzled5（配列番号4）、ラットFrizzled2（配列番号6）を挙げることができる。当該化合物は、ペプチド性でも非ペプチド性でもよいが、作用時間が長い利点がある非ペプチド性の阻害剤が好ましい。また、当該化合物は、標識したWNT-5A及びWNT-5A受容体を用いたスクリーニング系により選択することができ、好ましくはIC<sub>50</sub>が30μM以下のものであり、更に好ましくは10μM以下のものである。

10

WNT-5A産生を抑制する化合物とは、WNT-5A遺伝子の発現を抑制する化合物を意味する。当該化合物は、ペプチド性でも非ペプチド性でもよいが、作用時間が長い利点がある非ペプチド性の阻害剤が好ましい。また、当該化合物は、WNT-5A蛋白質量（配列番号1）又はWNT-5A mRNA量（配列番号2）の減少を指標として選択することができ、好ましくはHartleyらの方法（Drug Metabolism and Disposition 28（5），608-616（2000））、後述する試験例4）に準じた核酸プローブアッセイ方法によりIC<sub>50</sub>が30μM以下のものであり、更に好ましくは10μM以下のものである。

特に好ましくは、式（I）、（II）及び（IX）で表される化合物である。

式（I）、（II）及び（IX）で表される化合物においてC<sub>1-6</sub>アルキル基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルキル基を意味し、具体的には、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、2-エチルプロピル基、ヘキシル基等が挙げられる。

20

C<sub>1-6</sub>アルカノイル基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルカノイル基を意味し、具体的には、例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、t-ブチリル基等を挙げることができる。

C<sub>1-6</sub>アルコキシ基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルコキシ基を意味し、具体的には、例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、ペンチロキシ基、イソペンチロキシ基、ネオペンチロキシ基、tert-ペンチロキシ基、1-メチルブトキシ基、2-メチルブトキシ基、1,2-ジメチルプロポキシ基、ヘキシロキシ基、イソヘキシロキシ基等が挙げられる。

30

C<sub>1-6</sub>アルコキシイミノ基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルコキシイミノ基を意味し、具体的には、例えばN-メトキシイミノ基、N-エトキシイミノ基、N-プロポキシイミノ基、N-イソプロポキシイミノ基、N-ブトキシイミノ基、N-イソブトキシイミノ基、N-ペンチロキシイミノ基、N-ヘキシロキシイミノ基等が挙げられる。

C<sub>1-6</sub>アルカノイルオキシ基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルカノイルオキシ基を意味し、具体的には、例えばアセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ピバロイルオキシ基等が挙げられる。

40

C<sub>3-10</sub>シクロアルキル基とは、炭素数3～10のシクロアルキル基を意味し、具体的には、例えばシクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘブチル基、シクロオクチル基、シクロノニル基等が挙げられる。

置換C<sub>3-10</sub>シクロアルキル基の例としては、シクロアルキル基の水素原子をハロゲン原子、置換若しくは無置換のC<sub>1-10</sub>アルキル基、水酸基、C<sub>1-5</sub>ヒドロキシアルキル基、カルボキシ基、メルカプト基、インドリル基、C<sub>1-5</sub>アルキルチオ基、アミノ基、アミド基及びC<sub>1-5</sub>アルコキシ基からなる群より選ばれた1つ以上の基で置換されたシクロアルキル基を挙げることができる。

アリール基の例としては、フェニル基、ナフチル基、アントラセン基等を挙げることができる。

50

置換アリール基の例としては、アリール基の水素原子をハロゲン原子、置換若しくは無置換の  $C_{1-10}$  アルキル基、水酸基、 $C_{1-5}$  ヒドロキシアルキル基、カルボキシル基、メルカプト基、インダゾリル基、インドリル基、 $C_{1-5}$  アルキルチオ基、シアノ基、ニトロ基、アミノ基、アミド基、アセチルアミノ基及び  $C_{1-5}$  アルコキシ基からなる群より選ばれる1つ以上の基で置換されたアリール基を挙げることができる。

$C_{2-10}$  ヘテロ環の例としては、フラン、ピロール、チオフェン、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、イミダゾール、ピラゾール、ピラン、ピリジン、ピペリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、キノリン等を挙げることができる。

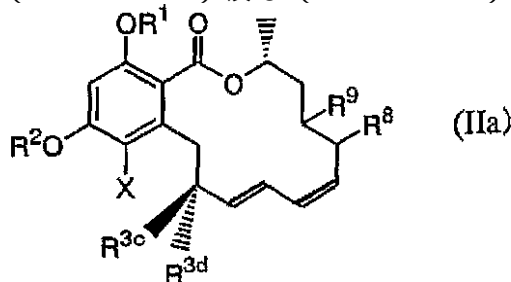
置換  $C_{2-10}$  ヘテロ環の例としては、ヘテロ環の水素原子をハロゲン原子、置換若しくは無置換の  $C_{1-10}$  アルキル基、水酸基、 $C_{1-5}$  ヒドロキシアルキル基、カルボキシル基、メルカプト基、インダゾリル基、インドリル基、 $C_{1-5}$  アルキルチオ基、シアノ基、ニトロ基、アミノ基、アミド基、アセチルアミノ基及び  $C_{1-5}$  アルコキシ基からなる群より選ばれる1つ以上の基で置換されたヘテロ環を挙げることができる。

エーテル結合とは、 $-O-$ 、式  $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$  (式中、 $m$  及び  $n$  はそれぞれ 1 ~ 3 の整数を表し、式中のアルキレン基はアルキル基で置換されていてもよい。) 又は、式  $-O-(CH_2)_m-O-$  (式中、 $m$  は 1 ~ 3 の整数を表し、式中のアルキレン基はアルキル基で置換されていてもよい。) を意味する。

パイ結合又はエーテル結合を形成する隣り合う基の組み合わせとしては、( $R^4$  と  $R^5$ )、( $R^5$  と  $R^6$ )、( $R^6$  と  $R^7$ )、( $R^7$  と  $R^8$  及び ( $R^8$  と  $R^9$ )) を挙げることができる (式 (IX) における  $R^{4a} \sim R^{9a}$  も同様)。

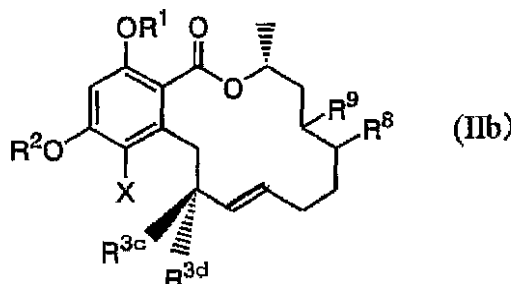
式 (IX) で表される化合物の中でより好ましくは式 (I) で表される化合物であり、更に好ましくは  $R^{3a}$  が水素原子であり、 $R^{3b}$  は水酸基である化合物である。また、化合物の安定性の点から、式 (IIa)、式 (IIb)、式 (IIc) で表される化合物が好ましい。

[式 (II) において ( $R^4$  と  $R^5$ ) 及び ( $R^6$  と  $R^7$ ) がパイ結合を形成する化合物]



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^{3c}$ 、 $R^{3d}$ 、 $R^8$ 、 $R^9$  及び  $X$  は前記と同意義である。)

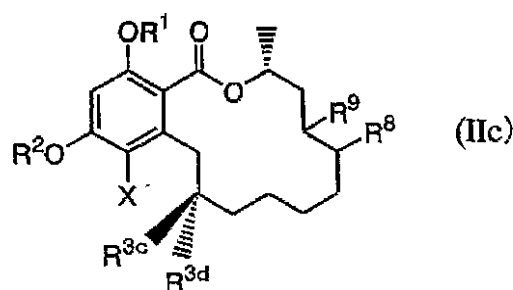
[式 (II) において ( $R^4$  と  $R^5$ ) がパイ結合を形成し、 $R^6$  及び  $R^7$  は水素原子を有する化合物]



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^{3c}$ 、 $R^{3d}$ 、 $R^8$ 、 $R^9$  及び  $X$  は前記と同意義である。)

[式 (II) において、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$  及び  $R^7$  が水素原子である化合物]





(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^{3c}$ 、 $R^{3d}$ 、 $R^8$ 、 $R^9$  及び  $X$  は前記と同意義である。)

また、式 (IX) で表される化合物のうち  $R^{3e}$  と  $R^{6b}$  が一緒になってエーテル結合を形成し、( $R^{3f}$  と  $R^{4a}$ ) 及び ( $R^{5a}$  と  $R^{6a}$ ) がパイ結合を形成する化合物 (例えば化合物 77 など) は、毛乳頭細胞における WNT-5A mRNA の発現を効果的に抑制し、毛乳頭細胞の増殖を促進する点で好ましい。

10

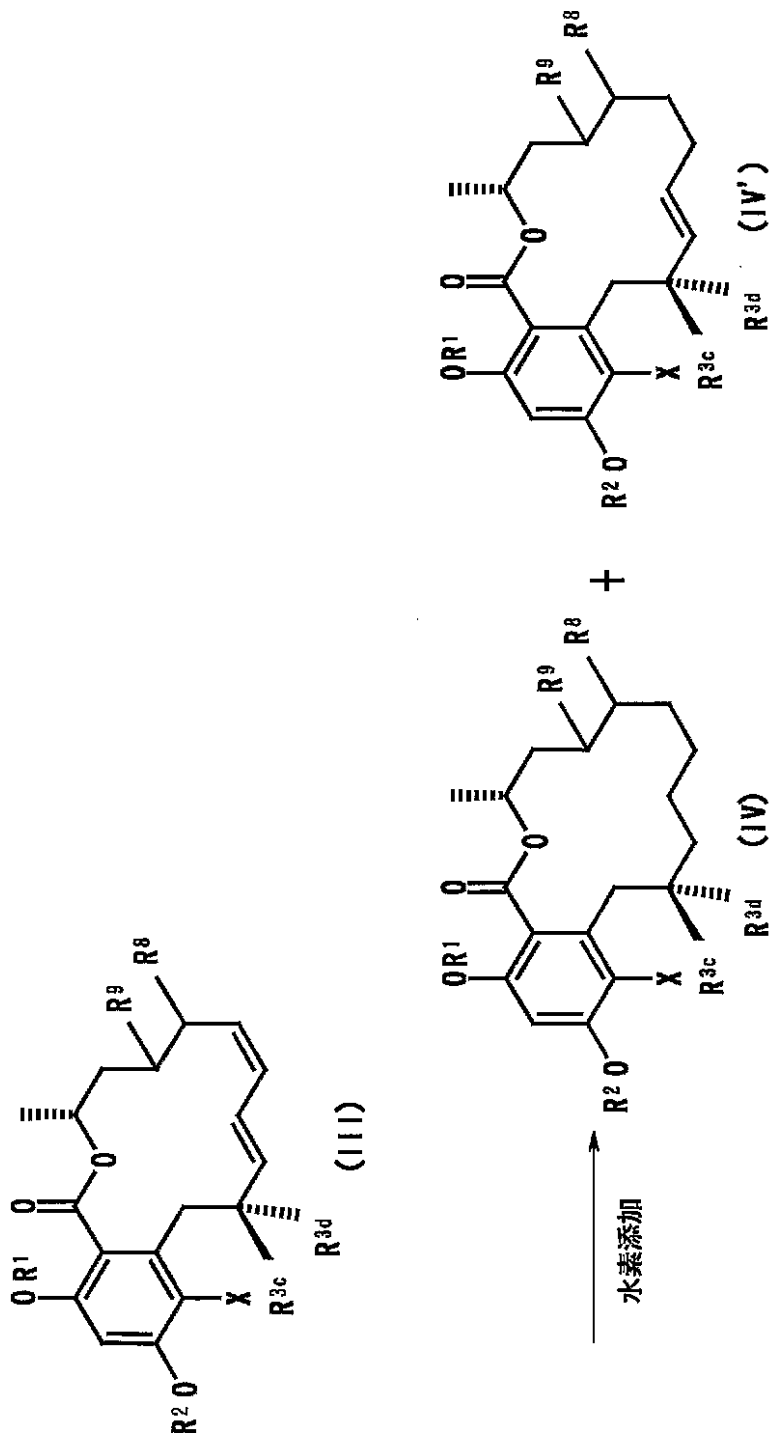
また、式 (IX) で表される化合物のうち  $R^{1a}$ 、 $R^{2a}$  が、 $(CH_2)_p CO - Y - R^{10}$  (式中、 $Y$  は酸素原子又は硫黄原子を示し、 $R^{10}$  は水素原子、 $C_{1-6}$  アルキル基又は置換若しくは無置換のアリール基を示し、 $p$  は 0 又は 1 を示す。) で表される基である化合物 (例えば化合物 52 など) や  $CO R^{12}$  (式中、 $R^{12}$  は置換若しくは無置換のアリール基又は置換若しくは無置換のヘテロ環を示す。) で表される基である化合物 (例えば化合物 58 など) は、毛乳頭細胞における WNT-5A mRNA の発現を効果的に抑制し、毛乳頭細胞の増殖を促進する点で好ましい。

20

また、 $R^{7a}$  が  $Z - R^{13}$  (式中、 $Z$  は酸素原子又は硫黄原子を示し、 $R^{13}$  は  $C_{2-6}$  アルカノイル基又は置換若しくは無置換のアリール基を示す。) で表される基である化合物 (例えば化合物 53 など) は、毛乳頭細胞における WNT-5A mRNA の発現を効果的に抑制し、毛乳頭細胞の増殖を促進する点で好ましい。

式 (II) で表される化合物は、例えば、以下の製法を組み合わせることにより製造することができる。

## 反応式 1



10

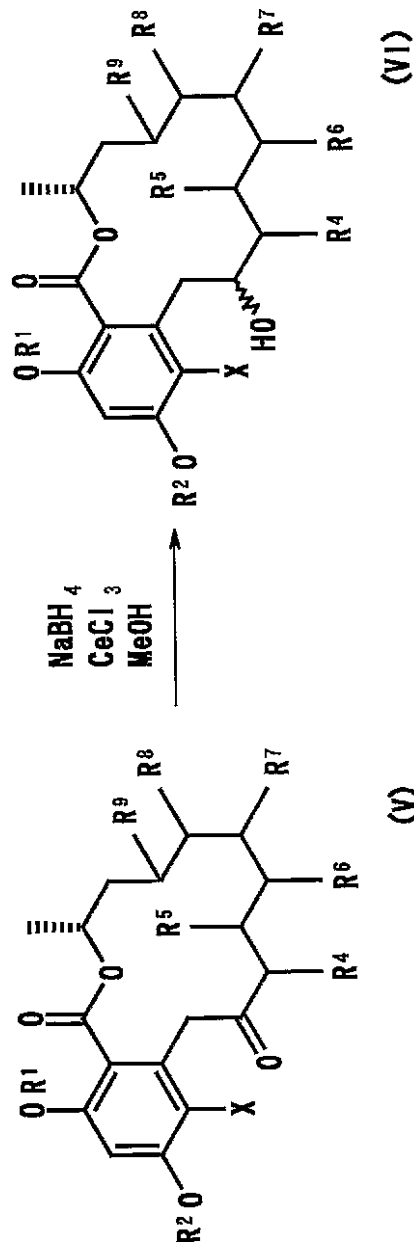
20

30

(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^{3c}$ 、 $R^{3d}$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 及び $X$ は前記と同意義である。)  
 式(III)の化合物をパラジウム炭素などの触媒存在下、有機溶媒(例えば、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど)中、水素添加反応を行い、式(IV)若しくは式(IV')の化合物、あるいはこれらの混合物を得る。これらの式(IV)及び式(IV')の化合物はカラムクロマトグラフィーなど通常用いられる分離法にて分離精製することができる。

40

## 反応式 2



10

20

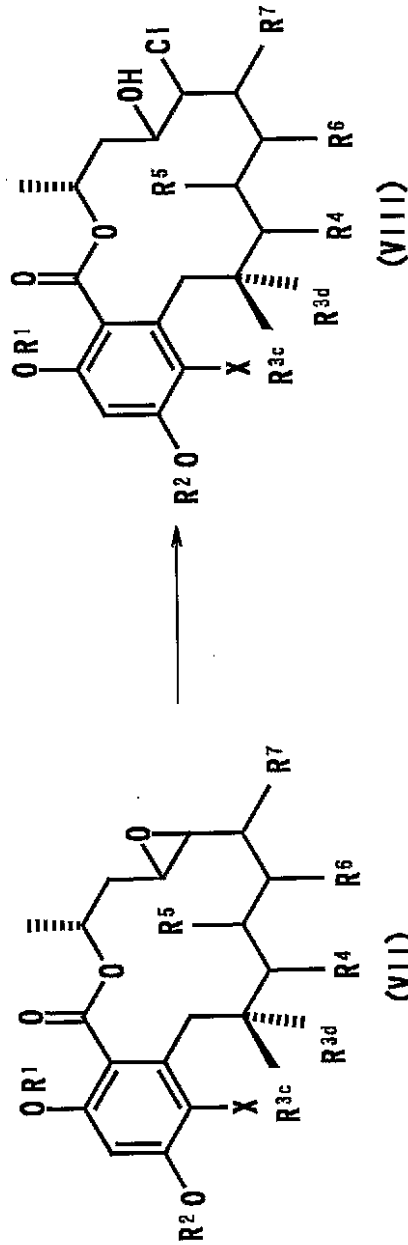
30

(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$  及び  $X$  は前記と同意義である。)

式 (V) の化合物を水素化ホウ素カリウム、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウムなどの還元剤と、必要に応じて  $LiCl$ 、 $MgCl_2$ 、 $CeCl_3$ 、 $CaCl_2$ 、 $NiCl$  等の塩類の共存下有機溶媒 (例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど) 中、 $-20 \sim 100$ 、好ましくは  $0 \sim 20$  で反応させ、式 (VI) の化合物を得る。式 (VI) の化合物はカラムクロマトグラフィーなど通常用いられる分離法にて分離精製することができる。

40

## 反応式 3



10

20

30

(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^{3c}$ 、 $R^{3d}$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$  及び  $X$  は前記と同意義である。)

式 (VII) の化合物を適当な有機溶媒 (例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど) 中、酸又は塩基で処理することにより、式 (VIII) の化合物を得る。

また、式 (IX) で表される化合物 (1, 60 ~ 78) の生産は、大略一般の発酵生産物を生産する場合に準じ、各種の栄養物を含む培地で *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* TF-0480 株を好氣的条件下で培養することにより行う。

40

培地は主として液体培地を用い、炭素源、窒素源、無機塩よりなり、必要に応じてビタミン類、先駆物質及び消泡剤を加えることができ、pH は 7 前後に調整する。炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、グリセリン、澱粉などを単独又は混合して用いる。窒素源としては、例えば肉エキス、オートミール、酵母エキス、大豆粉、ポリペプトン、コーンステープ・リカー、尿素、アンモニウム塩などを単独又は混合して用いる。無機塩としては、例えばリン酸一カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、炭酸カルシウムなどを単独又は混合して用いる。消泡剤としてはアデカノール、シリコン化合物を用いることができる。培養方法は振とう培養、通気攪拌培養などの好氣的培養が適してお

50

り、pH 4 ~ 10、25 ~ 35 で2 ~ 5日間、望ましくは25 ~ 28 で3日間培養する。

この培養により生産された1、60 ~ 78を単離するには、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行えばよい。例えば次のような方法が効果的である。すなわち、培養終了後遠心分離又は濾過により培養濾液を得、ダイイオンHP-20（商品名、三菱化学社製）などのポリスチレン樹脂に吸着させた後、低級アルコール、アセトンなどの有機溶媒で溶出させる。菌体は低級アルコール、アセトンなどの有機溶媒で抽出する。次いでこの菌体抽出液及び吸着樹脂からの溶出液を合わせて減圧濃縮し、残った水層に酢酸エチル、クロロホルム、n-ブタノールなどの有機溶媒を加え抽出し、抽出液を濃縮する。得られた残渣を再度ベンゼン、酢酸エチル、アセトン、メタノール、クロロホルムなどの有機溶媒に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー及び逆層分配用ODSを充填したカラムクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーを行うことにより本発明化合物を精製単離することができる。

10

本発明の有効成分を生産する菌株は、本発明者らが土壌から新たに分離した菌株であり、微生物の名称「ポコニア クラミドスポリア バラエティー クラミドスポリア TF-0480 (Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia TF-0480)」及び微生物寄託番号「FERM BP-8332」として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に2003年3月14日に寄託されている。

この菌株の菌学的性状を以下に示す。

20

#### 1) 培地上での生育状態

本菌は、各種寒天平板培地上で良好な生育を示し、試験した培地上で良好又は中程度に胞子を形成する。各種培地上、26、2週間で形成したコロニーの特徴を次の表1に示した。なお色の表示は、A. Kornerupら著『Dizionario dei colori』Musterschmidt (1978年)のカラーコードを引用した。

表1

培地	コロニーの肉眼的観察結果
PDA* - 1	生育及び孢子形成は比較的良好、コロニー径は23-28mm。コロニーは羊毛状、中心付近がフェルト状、やや盛り上がり、わずかに放射状のしわを生じる。周縁(コロニー先端部)はやや不規則となる。培地中にわずかに淡黄色(light yellow[3A6])の色素を分泌する。コロニー表面の色調は周縁付近で白色(white[1A1])、中心付近は淡黄色(pale yellow[4A3])を呈する。裏面は周縁付近が赤黄色(reddish yellow[4A6])、中心付近は黄褐色(Yellowish brown[5D8])を呈し、放射状または不規則に寒天培地が裂ける。
OMA* - 2	生育及び孢子形成は良好、コロニー径は48-50mm。コロニーの中心付近と中間部分が盛り上がり、やや希薄な羊毛状を呈する。周縁は比較的整い、色素の分泌は認められない。コロニー表面の色調は周縁付近で白色(white[1A1])、中心付近は淡黄色(light yellow[3A4])を呈する。裏面は表面と同じ淡黄色(light yellow[3A4])を呈する。
CMA* - 3	生育は良好だが孢子形成は中程度、コロニー径は47-51mm。コロニーは希薄なフェルト状を呈する。周縁は比較的整い、培地中への色素分泌は認められない。コロニーの色調は表裏共、白色(white[1A1])から黄白色(yellowish white[1A2])を呈する。
MA* - 4	生育及び孢子形成は比較的良好、コロニー径は26-27mm。コロニーの中心付近は盛り上がり、厚みのある羊毛状を呈する。周縁は比較的整い、培地中にわずかに赤黄色(reddish yellow[4A7])の色素を分泌する。コロニー表面の色調は周縁付近で白色(white[1A1])、中心付近は淡黄色(pale yellow[4A3])を呈する。裏面は周縁付近が淡オレンジ色(light orange[5A4])、中心付近は褐色(brown[7E8])、中間部分がオレンジ色(orange[6B7])を呈する。
SA* - 5	生育及び孢子形成は比較的良好、コロニー径は23-28mm。コロニーの中心付近が盛り上がり、厚みのある羊毛状を呈する。周縁はやや不規則、わずかに放射状のしわを生じる。培地中に赤黄色(reddish yellow[4A7])の色素を分泌する。コロニー表面の色調は周縁付近で白色(white[1A1])、他はオレンジ白色(orange white[5A2])を呈する。裏面は周縁および中心付近が淡オレンジ色(light orange[5A4])、中間部分が褐色(brown[7E8])を呈し、放射状に寒天培地が裂ける。
LCA* - 6	生育は良好だが孢子形成は中程度、コロニー径は42-44mm。コロニーは希薄なフェルト状からわずかに羊毛状を呈する。周縁は比較的整い、培地中への色素分泌は認められない。コロニーの色調は表裏共、白色(white[1A1])を呈する。

\*-1: ポテト・デキストロース寒天培地(栄研化学(株)製、E-MF21)

\*-2: 1/2希釈オートミール寒天培地(ディフコ社製、バクトオートミール寒天を1/2希釈で調製し、最終寒天濃度が2%になるように寒天を追加)

\*-3: コーンミール寒天培地(ディフコ社製、コーンミール寒天)

\*-4: 麦芽エキス寒天培地(Nakase, T., 6th ed., pp.617, Japan Collection of Microorganisms, the Institute of Physical and Chemical Research, Saitama, 1995)

\*-5: サブロー寒天培地(栄研化学(株)製、E-MF03)

\*-6: 三浦寒天培地(Miura, K. and M.Kudo, Trans. Mycol. Soc. Japan, 11:116-118, 1970)

## 2) 形態

本菌がコーンミール寒天平板上、26、14日間の培養で形成したコロニーを、光学顕微鏡にて観察した結果、分生子形成様式はフィアロ型であった。分生子形成細胞(フィアライド)は菌糸上に直接単生又は2~4個が輪生状に生じる、分生子柄は栄養菌糸との区別が不明瞭であった。分生子はフィアライドの先端で複数個形成され、粘塊状となる。フ

10

20

30

40

50

イアライドは先端部分が先細りの円筒形で、表面は平滑、無色、長さは13 - 35  $\mu\text{m}$ 、太さは基部で0.8 - 1.7  $\mu\text{m}$ 、先端付近では0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$ である。分生子は、楕円形から、まれに垂球形で、多くは基部がわずかに突出する。表面は平滑、無色、大きさは2.2 - 5.0  $\times$  1.8 - 2.8  $\mu\text{m}$ である。また、培地表面や培地上の菌糸から生じた短い柄の先端に淡黄色、多細胞、網状隔壁を有する厚膜胞子(ディクティオクラミドスポア)を単生する。わずかではあるが厚膜胞子は培地中でも形成される。厚膜胞子の大きさは、14 - 20  $\times$  12 - 22  $\mu\text{m}$ である。なお、培養を1カ月以上延長してもテレオモルフの形態は認められなかった。

### 3) 生理的性質

#### 1 生育温度範囲及び最適温度

本菌株はpH 6.0のサブロー液体培地において、15 ~ 31 の範囲で生育し、最適温度は25 ~ 27 である。

#### 2 生育pH範囲及び最適pH

本菌株はYpSs液体培地中26 においてpH 3 ~ 10の範囲で生育し、最適pHは5 ~ 7である。

#### 4) 好気性、嫌気性の区別; 好気性

上記の形態的特徴及び培養上の性状から、1 K. H. Domschら著『Compendium of soil fungi Vol. 1』IHW-Verlag(1980年)、及び2 G. L. Barron著『The Genera of Hyphomycetes from soil』Williams & Wilkins(1968年)等に記載された多くの既知種と本菌の特徴を比較検討した結果、Verticillium chlamydosporiaやDiheterospora chlamydosporiaの分類名称で知られる不完全菌の一菌種と極めて良く一致しており、同一種であることが示唆された。なお、本菌種は、3 R. Zare, W. Gams and H. C. Evans『A revision of Verticillium section Prostrata. V. The genus Pochonia, with notes on Rotiferophthora』73, 1-2, p51-86(2001年)により分子系統学的な再検討が行われ、Pochonia属を正式属名として再記載されており、さらに本菌のようにVerticillium型分生子が連鎖しない菌種に対し、Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporiaなる変種名が提唱されている。

以上のことから、本菌株を「ポコニア クラミドスポリア バラエティー クラミドスポリア TF-0480 (Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia TF-0480)」と命名した。

#### <毛乳頭細胞増殖促進剤>

本発明において「毛乳頭細胞増殖促進剤」とは、毛乳頭細胞の数を増加させる作用を有する医薬又は試薬を意味する。

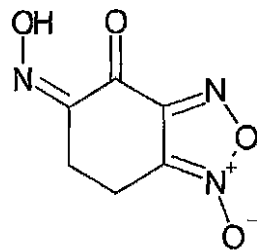
本発明の毛乳頭細胞増殖促進剤は、WNT-5A機能の阻害作用に基づくことを特徴とする。WNT-5Aは、WNT/catenin経路が活性化するWNT-1 classのWNTs(1、8など)の機能を抑制することから、WNT-5Aの機能の調整あるいはWNT-5Aの発現を調整することにより毛乳頭細胞の増殖を制御する。したがって、優れたWNT-5A機能の阻害作用を有すれば、全く構造の異なる化合物(例えば、化合物24、化合物79、化合物7など)であっても、優れた毛乳頭細胞増殖促進作用を有する。

10

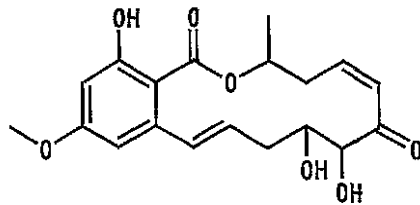
20

30

40

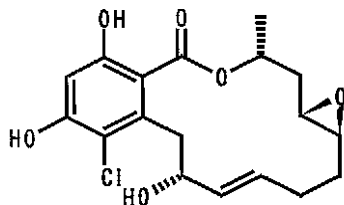


化合物24



化合物79

10



化合物7

細胞の増殖は、当業者に公知の方法により測定することが可能であり、例えば適当な発色基質を用いた生細胞数計測、 $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込み法等を挙げることができる。発色基質としては、MTT、MTS、XTT等のテトラゾリウム塩やアラマブルーを用いることが好ましい。

20

< 発毛剤 / 育毛剤 >

本発明において「発毛剤又は育毛剤」とは、発毛誘導、毛成長促進、脱毛予防などの目的で使用されるものである。本発明の発毛剤 / 育毛剤を医薬として用いる場合、適用対象としては、例えば円形脱毛症や男性型脱毛症の改善あるいは予防などを挙げることができる。

また、本発明の発毛剤 / 育毛剤の効果は、WNT-5A機能の抑制に基づく毛乳頭細胞増殖促進作用によるものである。かかる作用機序により脱毛部毛乳頭において低下している細胞増殖能を亢進し、発達した毛乳頭組織を形成するため、これまでの育毛剤 / 発毛剤では効果がえられなかった症状にも有効であることが予想される。

30

さらに他の作用点を有する発毛剤、育毛剤との組み合わせにより相乗的な効果を期待できる。

本発明の発毛剤 / 育毛剤は、それぞれの化合物に基づき、種々の投与量及び投与形態で投与することができる。

投与量は、育毛剤の種類、投与形態により異なるが、例えば、式(I X)で表される化合物を塗布投与(ローション剤、軟膏剤、ゲル剤等)する場合、0.0001~10重量%で投与することができ、好ましくは0.001~5重量%、更に好ましくは0.001~1重量%である。また、式(I X)で表される化合物を成人男性に経口投与(散剤、錠剤又はカプセル剤)する場合は、1~100mg/kg/日とすることが好ましい。

40

本発明の発毛剤 / 育毛剤の投与形態は特に限定されるものではないが、外用での使用では、WNT-5A産生抑制剤、例えば式(I X)で表される化合物、を有効成分とする発毛剤 / 育毛剤は、水溶性組成物の形態で提供されることが好ましい。このような水溶性組成物の製造には、本発明の効果を損なわない限り医薬品、医薬部外品又は化粧品の製造に用いられる各種の添加物(保湿剤、増粘剤、防腐剤、酸化防止剤、香料、色剤等)を配合することができる。本発明の発毛剤 / 育毛剤は、例えばヘアトニック、ヘアオイル、ヘアムース、ゲルなどの調髪用組成物、軟膏などとして提供することが可能である。

本発明の発毛剤及び育毛剤を液剤とする場合には、WNT-5A産生抑制剤、例えば式(I X)で表される化合物、を精製水、リン酸緩衝液等の適当な緩衝液、生理的食塩水、リ

50



ンガー溶液、ロック溶液等の生理的塩類溶液、エタノール、グリセリン及び慣用される界面活性剤等と適当に組み合わせた滅菌された水溶液、非水溶液、懸濁液、リポソーム又はエマルジョンとして調製され、頭皮用液状製剤として局所的に投与される。またその際、液状製剤を直接頭皮に塗布してもよく、スプレー等の射出ノズルを用いて塗布してもよい。

本発明の発毛剤及び育毛剤を半固形製剤とする場合には、WNT-5A産生抑制剤、例えば式(I X)で表される化合物を脂肪、脂肪油、ラノリン、ワセリン、パラフィン、蠟、硬膏剤、樹脂、プラスチック、グリコール類、高級アルコール、グリセリン、水、乳化剤、懸濁化剤等と混和して軟膏、クリーム等の外用として局所投与できる。

本発明の発毛剤及び育毛剤を固形製剤とする場合には、WNT-5A産生抑制剤、例えば式(I X)で表される化合物、を適当な添加剤と適宜混合して、散剤、粉剤等の外用剤として、又は、溶剤に用時溶解又は懸濁して頭皮に塗布するための固形製剤としてもよい。また、経口での使用する場合には、WNT-5A産生抑制剤、例えば式(I X)で表される化合物、を製剤上許容しうる担体(賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤など)、希釈剤、溶解補助剤などと配合して得られる医薬組成物を通常の方法に従って製剤して得られる錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、溶液剤などの形態で提供されることが望ましい。

なお、これらの製剤化は、通常の製剤化技術を使用することができる

<スクリーニング方法>

本発明はまた、WNT-5Aの機能を阻害する化合物を選択することを特徴とする、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法である。

WNT-5Aの機能を阻害する化合物(以下、「WNT-5A機能阻害剤」ということがある。)を選択するとは、例えば、WNT-5A産生抑制剤を選択、即ちスクリーニングすることでもよく、また、WNT-5A受容体アンタゴニストを選択することでもよい。本発明のスクリーニング方法に供される被検物質としては、任意の物質を使用することができる。被検物質の種類は特に限定されず、個々の低分子化合物でよいし、天然物抽出中に存在する化合物でもよく、合成ペプチドでもよい。また、化合物ライブラリー、コンビナトリアルライブラリーであってもよい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。スクリーニングの対象とする化合物は、医薬品として用いる観点から分子量3000以下であることが好ましく、塗布/経口投与を可能とする観点から、分子量600以下の低分子化合物であることが好ましい。

#### 1 WNT-5A受容体アンタゴニストのスクリーニング方法

WNT-5A受容体アンタゴニストのスクリーニング方法において、標識したWNT-5A蛋白質及びWNT-5A受容体を用いて、該標識を検出又は測定することにより、WNT-5A蛋白質とWNT-5A受容体の結合の形成の有無を調べてもよい。標識としては、放射性同位元素(32P、33P、131I、125I、3H、14C、35S等)、酵素(アルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュパーオキシターゼ等)、蛍光物質(フルオロセインイソチオシアネート等)等を挙げることができる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

*in vitro*のアッセイ系の1つの具体例は、非細胞系において行われる。具体的にはWNT-5A蛋白質又はWNT-5A受容体のいずれか一方を支持体に結合させ、ここにもう一方と被検物質を加え、インキュベートした後洗浄して支持体に結合した蛋白質に対するもう一方の蛋白質の結合を検出又は測定すればよい。

蛋白質を結合させる支持体としては、例えば不溶性の多糖類、例えば、アガロース、デキストラン、セルロース、合成樹脂、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等が挙げられる。より具体的にはそれらを原料として製造される市販のビーズ、プレートが用いられる。

#### 2 WNT-5A産生抑制化合物のスクリーニング方法

WNT-5A産生抑制化合物のスクリーニングは、WNT-5A mRNA量又はWNT

- 5 A 蛋白質量を指標として行うことができる。また、WNT - 5 A 遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子を連結して発現量を検出することもできる。WNT - 5 A 遺伝子のプロモーターとしては、配列番号 3 を使用することが好ましい。

レポーター遺伝子としては、例えば、GFP 遺伝子 (Green Fluorescent Protein)、GUS 遺伝子 (- Glucuronidase)、LUC 遺伝子 (Luciferase)、CAT (Chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子を挙げることができる。

WNT - 5 A mRNA 量を指標とした場合としては、例えば、ヒト WNT - 5 A 発現細胞を用い、被検物質を添加し、37、5% CO<sub>2</sub> - 95% air のインキュベータ内で数時間培養後、細胞を溶解して RNA を抽出し、RT - PCR などを用いて WNT - 5 A mRNA 量を測定することにより、WNT - 5 A mRNA 量を減少させる活性を有する物質を探索することができる。PCR に用いるプライマーとしては、WNT - 5 A mRNA に特異的なものであれば特に制限はなく、WNT - 5 A mRNA の配列から設計することができるが、好ましくは、Forward Primer AATGTCCTTC CAAGTTCCTTCCTAGTGGC (配列番号 8) 及び Reverse Primer GATGTCGGAATTGATACTGGCA (配列番号 9) である。

WNT - 5 A 蛋白質量を指標とした場合としては、例えば、ヒト WNT - 5 A 発現細胞を用い、被検物質を添加し、37、5% CO<sub>2</sub> - 95% air のインキュベータ内で数時間培養後、培養培地を用いて又は細胞を溶解して蛋白質を抽出し、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 等を用いて WNT - 5 A 蛋白質量を測定することにより、WNT - 5 A 蛋白質発現量を減少させる活性を有する物質を探索することができる。

以下、実験例に基づき本発明を更に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1 (化合物 3、4)

ラジシコール (化合物 1 : 10.8 g) を酢酸エチル (140 ml) に溶解し、5% パラジウム炭素 (ウェットタイプ) (255 mg) を加え、水素置換 (1 気圧) し室温で 3 時間攪拌した。パラジウム炭素を濾過後、濾液を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、n - ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1 で溶出させることで、目的化合物 4 (3.43 g) を得、n - ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2 で溶出させることで、目的化合物 3 (4.14 g) を得た。

#### 実施例 2 (化合物 7、8)

化合物 3 (602.5 mg) をメタノール (13 ml) に溶解し、塩化セリウム (III) 7 水和物 (2.14 g) を加え、室温で 30 分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム (180 mg) を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で 5 分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム (40 ml) を加え水 (40 ml) で希釈した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル (300 ml x 2) で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー (20 cm x 20 cm, 1.0 mm 厚、ククロホルム : メタノール = 93 : 7 で展開、酢酸エチルで溶出) により粗精製した。得られた粗精製物を高速液体クロマトグラフィー (20 x 250 mm, YMC-Pack Pro C18, 水 (酢酸添加、pH 3.5) : アセトニトリル = 65 : 35 で溶出) により精製し、目的化合物 (化合物 7 : 144.9 mg、化合物 8 : 13.8 mg) を得た。

#### 実施例 3 (化合物 9, 10)

化合物 4 (26.5 mg) をメタノール (5 ml) に溶解し、塩化セリウム (III) 7 水和物 (100 mg) を加え、室温で 30 分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム (60 mg) を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で 30 分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム (12 ml) を加え水 (20 ml) で希釈した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル (30 ml x 2) で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄

10

20

30

40

50

層クロマトグラフィー (20 cm × 20 cm, 0.25 mm 厚、クロロホルム : メタノール = 9 : 6 で展開、酢酸エチルで溶出) により精製し、目的化合物 (化合物 9 : 5.7 mg、化合物 10 : 8.8 mg) を得た。

#### 実施例 4 (化合物 5)

ラディシコール (91.5 mg) をメタノール (5 ml) に溶解し、塩化セリウム (III) 7 水和物 (88 mg) を加え、室温で 10 分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム (60 mg) を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で 30 分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム (20 ml) を加え水 (20 ml) で希釈した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル (50 ml × 3) で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー (20 cm × 20 cm, 0.5 mm 厚、クロロホルム : メタノール = 9 : 1 で展開、酢酸エチルで溶出) により精製し、目的化合物 5 (27.2 mg) を得た。

10

#### 実施例 5 (化合物 2)

ラディシコール (15.3 mg) をピリジン (1.5 ml) に溶解し、無水酢酸 (4 ml) を加え室温で 6.5 時間攪拌した後、反応液に氷水 (20 ml) を加え酢酸エチル (20 ml) で抽出した。酢酸エチル層を水 (20 ml × 2) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー (20 cm × 20 cm, 0.5 mm 厚、クロロホルム : メタノール = 9.5 : 5 で展開、酢酸エチルで溶出) により精製し、目的化合物 2 (18.5 mg) を得た。

20

#### 実施例 6 (化合物 11)

ラディシコール (19.0 mg) をジメチルスルホキシド (1 ml) に溶解し、炭酸カリウム (3 mg) とヨウ化メチル (4 ml) を加え室温で 6.5 時間攪拌した。反応液に水 (20 ml) を加え酢酸エチル (20 ml) で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー (20 cm × 20 cm, 0.5 mm 厚、クロロホルム : メタノール = 9.5 : 5 で展開、酢酸エチルで溶出) により精製し、目的化合物 11 (15.3 mg) を得た。

#### 実施例 7 (化合物 16、17、19、23)

ラディシコール (930 mg) を 1,4-ジオキサソラン (14 ml) に溶解し、1 規定塩酸 (12 ml) を加え室温で 2 時間攪拌した後、水 (40 ml) で希釈し酢酸エチル (100 ml) で抽出した。酢酸エチルを無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー (20 cm × 20 cm, 1.0 mm 厚、クロロホルム : メタノール : n-ヘキサン = 5 : 1 : 5 で展開、酢酸エチルで溶出) により粗精製した。得られた粗精製物を高速液体クロマトグラフィー (20 × 250 mm, YMC-Pack Pro C18, 水 (酢酸添加、pH 3.5) : アセトニトリル = 70 : 30 ~ 40 : 60、グラジエントで溶出) により精製し、目的化合物 (化合物 16 : 11.4 mg、化合物 17 : 19.4 mg、化合物 19 : 32.6 mg、化合物 23 : 103.7 mg) を得た。

30

#### 実施例 8 (化合物 12、13)

ラディシコール (232.6 mg) を 1,4-ジオキサソラン (4 ml) に溶解し、1 規定塩酸 (1 ml) を加え室温で 30 分間攪拌した後、1 規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを 20 ml 加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー (20 × 250 mm, YMC-Pack Pro C18, 水 (酢酸添加、pH 3.5) : アセトニトリル = 65 : 35 で溶出) により精製し、目的化合物 (化合物 12 : 42.6 mg、化合物 13 : 10.4 mg) を得た。

40

#### 実施例 9 (化合物 18)

5 ml のジメチルホルムアミドに 1 ml のオキシ塩化リンを氷冷しながら滴下した後、室温で 30 分間攪拌した。この溶液をラディシコール (98.5 mg) のジメチルホルムアミド溶液 (4 ml) に氷冷しながら徐々に加えた後、室温で 24 時間攪拌した。反応液を

50

酢酸エチル (100 ml) で希釈した後、水 (100 ml × 3) で洗浄し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー (20 cm × 20 cm, 0.5 mm 厚、クロロホルム : メタノール = 94 : 6 で展開、酢酸エチルで溶出) により精製し、目的化合物 (化合物 18) (61.8 mg) を得た。

実施例 10 (化合物 14、15)

ラディシコール (378 mg) を 1, 4 - ジオキサン (4 ml) に溶解し、1 規定塩酸 (1 ml) を加え室温で 20 分間攪拌した後、1 規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを 20 ml 加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー (20 × 250 mm, YMC - Pack Pro C18, 水 (酢酸添加、pH 3.5) : アセトニトリル = 70 : 30 で溶出) により精製し、目的化合物 (化合物 14 : 10.7 mg、化合物 15 : 9.9 mg) を得、同時に化合物 12 (40.6 mg) も得られた。

10

実施例 11 (化合物 20、21、22)

化合物 3 (96.3 mg) を 1, 4 - ジオキサン (2 ml) に溶解し、1 規定塩酸 (2.5 ml) を加え室温で 16 時間攪拌した後、1 規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを 20 ml 加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー (20 × 250 mm, YMC - Pack Pro C18, 水 (酢酸添加、pH 3.5) : アセトニトリル = 45 : 55 で溶出) により精製し、目的化合物 (化合物 20 : 9.3 mg、化合物 21 : 22.0 mg、化合物 22 : 26.2 mg) を得た。

20

実施例 12 (化合物 25、26)

化合物 7 (34 mg) を N, N - ジメチルホルムアミド (2 ml) に溶解し、水酸化カリウム (3 mg) とヨウ化メチル (500 μl) を加え室温で 4.5 時間攪拌した。反応液に水 (20 ml) を加え酢酸エチル (20 ml) で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル - 水 (pH 3.5、酢酸) (38 : 62) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [カラム : YMC - Pack Pro C18 AS - 343 (20 × 250 mm)、検出 UV 吸収 254 nm、流速 10 ml/min] にて精製し、2 つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物 25 (6.4 mg, 39 min)、化合物 26 (14.5 mg, 29 min) を得た。

30

実施例 13 (化合物 27)

化合物 7 (55 mg) をピリジン (1 ml) に溶解し、無水酢酸 (3 ml) を加えた後、室温で 17 時間攪拌した。反応液に水 (50 ml) を加え酢酸エチル (50 ml) で抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル - 水 (pH 3.5、酢酸) (60 : 40) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [カラム : YMC - Pack Pro C18 AS - 343 (20 × 250 mm)、検出 UV 吸収 254 nm、流速 10 ml/min] にて精製し、得られた画分を減圧濃縮して、化合物 27 (64.7 mg, 18 min) を得た。

40

実施例 14 (化合物 28、29)

化合物 8 (131 mg) を N, N - ジメチルホルムアミド (2 ml) に溶解し、水酸化カリウム (3 mg) とヨウ化メチル (2 ml) を加え室温で 7 時間攪拌した。反応液に水 (40 ml) を加え酢酸エチル (40 ml) で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル - 水 (pH 3.5、酢酸) (38 : 62) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [カラム : YMC - Pack Pro C18 AS - 343 (20 × 250 mm)、検出 UV 吸収 254 nm、流速 10 ml/min] にて精製し、2 つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物 28 (14.2 mg, 52 min)、化合物 29 (31.7 mg, 37 min) を得た。

50

## 実施例 15 (化合物 30)

化合物 8 (72 mg) をピリジン (2 ml) に溶解し、無水酢酸 (2 ml) を加えた後、室温で 17 時間攪拌した。反応液に水 (50 ml) を加え酢酸エチル (50 ml) で抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル - 水 (pH 3.5、酢酸) (53 : 47) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [カラム : YMC - Pack Pro C18 AS - 343 (20 × 250 mm)、検出 UV 吸収 254 nm、流速 10 ml/min] にて精製し、得られた画分を減圧濃縮して、化合物 30 (45.5 mg, 30 min) を得た。

## 実施例 16 (化合物 31)

ラディシコール (10.8 g) を酢酸エチル (140 ml) に溶解し、5% パラジウム炭素 (ウェットタイプ) (255 mg) を加え、水素置換 (1 気圧) し室温で 3 時間攪拌した。パラジウム炭素を濾過後、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー [Silica Gel 60 (商品名、Merck 社製)] にて精製し、n - ヘキサン : 酢酸エチル (2 : 1) で溶出させることで、化合物 4 (3.43 g) を得、また n - ヘキサン : 酢酸エチル (3 : 2) で溶出させることで、化合物 3 (4.14 g) を得た。化合物 3 と化合物 4 の間の画分 (3.08 g) の一部 (500 mg) を少量の N, N - ジメチルホルムアミドに溶解し、アセトニトリル - 水 (pH 3.5、酢酸) (38 : 62) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [カラム : YMC - Pack Pro C18 AS - 343 (20 × 250 mm)、検出 UV 吸収 254 nm、流速 10 ml/min] にて精製し、2 つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物 3 (177.8 mg) とともに化合物 31 (20.7 mg, 23 min) を得た。

## 実施例 17 (化合物 32, 33, 34)

ラディシコール (11.9 g) を酢酸エチル (160 ml) に溶解し、5% パラジウム炭素 (ウェットタイプ) (300 mg) を加え、水素置換 (1 気圧) し室温で 3 時間攪拌した。パラジウム炭素を濾過後、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー [Silica Gel 60 (商品名、Merck 社製)] にて精製し、n - ヘキサン : 酢酸エチル (2 : 1) で化合物 4 を溶出させ、n - ヘキサン : 酢酸エチル (3 : 2) で化合物 3 を溶出させた。さらに n - ヘキサン : 酢酸エチル (1 : 1) で溶出した画分を減圧濃縮し、粗精製物 (936 mg) を得た。得られた粗精製物を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル - 水 (pH 3.5、酢酸) (34 : 66) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [カラム : YMC - Pack Pro C18 AS - 343 (20 × 250 mm)、検出 UV 吸収 254 nm、流速 10 ml/min] にて精製し、3 つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物 32 (17.4 mg, 17 min)、化合物 33 (49.4 mg, 18 min) 及び化合物 34 (347.4 mg, 21 min) を得た。

## 実施例 18 (化合物 35)

ラディシコール (210 mg) をピリジン (4 ml) に溶解し、室温でヒドロキシルアミン塩酸塩 (180 mg) を加えた後、40 に昇温し 2.5 時間攪拌した。室温に戻した後、水 (100 ml) を加え酢酸エチル (80 ml) で抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー [Silica Gel 60 F254 (商品名、Merck 社製)、厚さ 0.5 mm] にてクロロホルム - メタノール (90 : 10) を展開溶媒として精製し、Rf 値が 0.65 の部分を回収して酢酸エチルで抽出、減圧濃縮して化合物 35 (40.0 mg) を得た。

## 実施例 19 (化合物 36, 37, 38, 39)

ラディシコール (11.9 g) を酢酸エチル (160 ml) に溶解し、5% パラジウム炭素 (ウェットタイプ) (300 mg) を加え、水素置換 (1 気圧) し室温で 3 時間攪拌した。パラジウム炭素を濾過後、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー [Silica Gel 60 (商品名、Merck 社製)] にて精製し、n

10

20

30

40

50

-ヘキサン：酢酸エチル（2：1）で溶出した画分を減圧濃縮し、化合物4を主成分とする画分（1537mg）を得た。この画分をメタノール（21ml）/テトラヒドロフラン（7ml）に溶解し、塩化セリウム（III）7水和物（2130mg）を加え、室温で30分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム（790mg）を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で10分間攪拌した。反応液を水（30ml）で希釈した後1規定塩酸水溶液を加えpHを中性にした後、さらに水（30ml）で希釈する。水層を酢酸エチル（100ml×2）で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去し、ガム状物質（1.46g）を得た。得られた物質をクロロホルム-メタノール（4：1）の混合溶媒に溶解し、n-ヘキサンで湿潤させて調製したシリカゲル[Silica Gel 60（商品名、Merck社製）]のカラム（400ml）に吸着させた。n-ヘキサン-酢酸エチルの混合溶媒で順次溶出し、n-ヘキサン-酢酸エチル（2：1）で化合物4を溶出させた後、n-ヘキサン-酢酸エチル（3：2）で溶出し、画分（1）（190mg）、画分（2）（398mg）をそれぞれ減圧濃縮することで得た。

10

画分（1）を少量のテトラヒドロフランで溶解し、アセトニトリル-水（pH3.5、酢酸）（35：65）を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー[カラム：YMC-Pack Pro C18 AS-343（20×250mm）、検出UV吸収254nm、流速10ml/min]にて精製し、3つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物9（87.2mg）とともに化合物36（11.3mg, 20min）、化合物38（10.1mg, 25min）を得た。

20

また画分（2）を少量のテトラヒドロフランで溶解し、画分（1）と同条件で分取高速液体クロマトグラフィーにて精製し、2つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物37（19.8mg, 25min）、化合物39（23.2mg, 27min）を得た。

実施例20（化合物40, 41）

化合物7（61mg）をN,N-ジメチルホルムアミド（3ml）に溶解し、水酸化カリウム（5mg）と1-プロモブタン（1ml）を加え室温で3.5時間攪拌した。反応液に水（20ml）を加え酢酸エチル（30ml）で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル-水（pH3.5、酢酸）を移動層として（60：40）～（90：10）のグラジエントをかけ、分取高速液体クロマトグラフィー[カラム：YMC-Pack Pro C18 AS-343（20×250mm）、検出UV吸収254nm、流速10ml/min]にて精製し、2つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物40（25.6mg, 33min）、化合物41（21.4mg, 40min）を得た。

30

実施例21（化合物42, 43）

化合物7（67mg）をN,N-ジメチルホルムアミド（3ml）に溶解し、水酸化カリウム（5mg）と1-プロモヘキサン（1ml）を加え室温で3.5時間攪拌した。反応液に水（20ml）を加え酢酸エチル（30ml）で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル-水（pH3.5、酢酸）を移動層として（60：40）～（90：10）のグラジエントをかけ、分取高速液体クロマトグラフィー[カラム：YMC-Pack Pro C18 AS-343（20×250mm）、検出UV吸収254nm、流速10ml/min]にて精製し、2つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物42（24.9mg, 38min）、化合物43（32.9mg, 53min）を得た。

40

実施例22（化合物44）

化合物7（62mg）をN,N-ジメチルホルムアミド（3ml）に溶解し、水酸化カリウム（5mg）と1-プロモプロパン（1ml）を加え室温で1.5時間攪拌した。反応液に水（20ml）を加え酢酸エチル（30ml）で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル-水（pH3.5、酢酸）を移動層として（45：55）～（85：15）のグラジエントをかけ、分取高速液体クロマトグラフィー[カラム：YMC-Pack Pro C18 AS-343（20×250mm）、検出UV吸収254nm、流速10ml/min]にて精製し、2つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物44（24.9mg, 38min）、化合物45（32.9mg, 53min）を得た。

50

k Pro C18 AS-343 (20 × 250 mm)、検出UV吸収254 nm、流速10 ml/min]にて精製し、得られた画分を減圧濃縮して、化合物44 (45.3 mg, 38 min)を得た。

#### 実施例23 (化合物45)

化合物7 (64 mg)をN,N-ジメチルホルムアミド (3 ml)に溶解し、水酸化カリウム (5 mg)と2-(プロモメチル)シクロヘキサン (2 ml)を加え室温で7時間攪拌した。反応液に水 (20 ml)を加え酢酸エチル (30 ml)で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル-水 (pH 3.5、酢酸)を移動層として (65:35) ~ (85:15)のグラジエントをかけ、分取高速液体クロマトグラフィー [カラム: YMC-Pack Pro C18 AS-343 (20 × 250 mm)、検出UV吸収254 nm、流速10 ml/min]にて精製し、得られた画分を減圧濃縮して、化合物45 (24.7 mg, 70 min)を得た。

10

#### 実施例24 (化合物46)

化合物7 (200 mg)をN,N-ジメチルホルムアミド (10 ml)に溶解し、臭化水素酸 (5 ml)を加え110 °Cで6時間攪拌した。反応液に酢酸エチル (150 ml)を加え炭酸水素ナトリウム (150 ml × 2)で洗浄し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣を少量のメタノールに溶解し、アセトニトリル-水 (pH 3.5、酢酸)を移動層として (38:62) ~ (50:50)のグラジエントをかけ、分取高速液体クロマトグラフィー [カラム: YMC-Pack Pro C18 AS-343 (20 × 250 mm)、検出UV吸収254 nm、流速10 ml/min]にて精製し、得られた画分を分取し減圧濃縮して、化合物46 (17.0 mg, 18 min)を得た。

20

#### 実施例25 (化合物47)

化合物62 (154 mg)を酢酸エチル (5 ml)に溶解し、5%パラジウム炭素 (ウェットタイプ) (30 mg)を加え、水素置換 (1気圧)し室温で90分間攪拌した。パラジウム炭素を濾過後、濾液を減圧濃縮して、化合物47 (134.8 mg)を得た。

#### 実施例26 (化合物48)

化合物61 (211 mg)を酢酸エチル (11 ml)に溶解し、5%パラジウム炭素 (ウェットタイプ) (42 mg)を加え、水素置換 (1気圧)し室温で90分間攪拌した。パラジウム炭素を濾過後、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣 (184 mg)を分取薄層クロマトグラフィー [Silica Gel 60 F254 (商品名、Merck社製)、20 cm × 20 cm、厚さ0.5 mm]にてクロロホルム-メタノール (95:5)を展開溶媒として精製し、Rf値が0.5の部分を回収して酢酸エチルで抽出した後、減圧濃縮して化合物48 (159.7 mg)を得た。

30

#### 実施例27 (化合物49, 50)

化合物61 (233 mg)をメタノール (10 ml) / テトラヒドロフラン (2 ml)に溶解し、塩化セリウム (III) 7水和物 (754 mg)を加え、室温で30分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム (236 mg)を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で10分間攪拌した。反応液を水 (30 ml)で希釈した後1規定塩酸水溶液 (3 ml)を加えpHを中性にした後、さらに水 (30 ml)で希釈する。水層を酢酸エチル (100 ml × 2)で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去し、白色粉末 (267 mg)を得た。得られた粉末を少量のメタノールで溶解し、アセトニトリル-水 (pH 3.5、酢酸) (45:55)を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [カラム: YMC-Pack Pro C18 AS-343 (20 × 250 mm)、検出UV吸収254 nm、流速10 ml/min]にて精製し、2つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物49 (49.3 mg, 19 min)、化合物50 (184.6 mg, 21 min)を得た。

40

#### 実施例28 (化合物51)

化合物62 (191 mg)をメタノール (10 ml) / テトラヒドロフラン (4 ml)に

50

溶解し、塩化セリウム(III)7水和物(641mg)を加え、室温で30分間撹拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム(216mg)を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で10分間撹拌した。反応液を水(30ml)で希釈した後1規定塩酸水溶液(3ml)を加えpHを中性にした後、さらに水(30ml)で希釈する。水層を酢酸エチル(100ml×2)で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去し、無色油状物質(182mg)を得た。得られたオイルを少量のメタノールで溶解し、アセトニトリル-水(pH3.5、酢酸)(30:70)を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー[カラム:YMC-Pack Pro C18 AS-343(20×250mm)、検出UV吸収254nm、流速10ml/min]にて精製し、得られた画分を減圧濃縮して、化合物51(137.3mg, 29min)を得た。

10

#### 実施例29(化合物52)

ラディシコール(205mg)をアセトン(10ml)に溶解し、S-クロロアセチルチオフェノール(330mg)及び炭酸カリウム(310mg)を加え、室温で1.5時間撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧乾固させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(20g、酢酸エチル:n-ヘキサン=1:2)により粗精製した。得られた粗精製物を高速液体クロマトグラフィー(20×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5):アセトニトリル=65:35で溶出)により精製し、化合物52(105mg)を得た。

20

#### 実施例30(化合物53)

ラディシコール(406mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(6ml)に溶かし、氷冷下トリエチルアミン(57.6mg)及びチオフェノール(260mg)を加え、引き続き氷冷下一晩撹拌した。反応液に希塩酸を加え、酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で順に洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧乾固させた。得られた残渣のうちの238mgを高速液体クロマトグラフィー(20×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5):アセトニトリル=65:35で溶出)により精製し、化合物53(46.0mg)を得た。

#### 実施例31(化合物54, 55)

ラディシコール(378mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(6ml)に溶かし、氷冷下トリエチルアミン(56.4mg)及びチオ酢酸(163mg)を加え、引き続き氷冷下一晩撹拌した。反応液に希塩酸を加え、酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で順に洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧乾固させた。得られた残渣のうちの238mgを高速液体クロマトグラフィー(20×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5):アセトニトリル=65:35で溶出)により精製し、化合物54(49.0mg)、化合物55(15.7mg)を得た。

30

#### 実施例32(化合物56)

ラディシコール(131mg)をアセトン(10ml)に溶解し、プロモ酢酸メチル(219mg)及び炭酸カリウム(183mg)を加え、室温で3時間撹拌した。反応液に希塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥して、減圧乾固させた。得られた残渣を酢酸エチルより再結晶して化合物56(81.8mg)を得た。

40

#### 実施例33(化合物57)

化合物7(116mg)をアセトン(10ml)に溶解し、プロモ酢酸メチル(330mg)及び炭酸カリウム(276mg)を加え、室温で3日間撹拌した。反応液に希塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧乾固させた。得られた残渣を酢酸エチルより再結晶して化合物57(27.7mg)を得た。

#### 実施例34(化合物58)

ラディシコール(103mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(6ml)に溶解し、ニ

50



コチン酸 ( 190 mg )、1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド塩酸塩 ( 270 mg ) 及び 4 - ジメチルアミノピリジン ( 37.7 mg ) を加え、室温で 3.5 時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧乾固させた。得られた残渣をアセトン - 水より再結晶して化合物 58 ( 94.5 mg ) を得た。

#### 実施例 35 ( 化合物 59 )

化合物 56 ( 312 mg ) をメタノール ( 60 ml ) に懸濁し、水酸化カリウム ( 206 mg ) - 水 ( 20 ml ) を加え室温で 15 分攪拌した。反応液に希塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧乾固させた。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー ( 20 × 250 mm, YMC - Pack Pro C18, 水 ( 酢酸添加、pH 3.5 ) : アセトニトリル = 65 : 35 で溶出 ) により精製し、化合物 59 ( 10.6 mg ) を得た。

10

#### 実施例 36 ( 化合物 60, 61, 62, 63, 68, 70 )

グルコース 2.0%、マンニトール 4.0%、オートミール 2.0%、酵母エキス 0.4%、硫酸鉄 ( II ) · 7 水和物 0.001%、硫酸亜鉛 ( II ) 7 水和物 0.001%、硫酸マンガン ( II ) 4 - 5 水和物 0.001%、硫酸銅 ( II ) 5 水和物 0.0005% からなる pH 6 の無菌液体培地に *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* TF - 0480 株を接種し、26、72 時間振盪培養した。次に 50 L 容ジャー 1 基を用いて、種培養と同じ組成の無菌培地 30 L に前記種培養液 300 ml を接種し、26、144 時間攪拌通気培養した。培養終了後培養液を遠心分離し、菌体と上清に分離した。上清を 1.5 L の HP - 20 ( 商品名、三菱化学社製 ) に吸着させ、水で洗浄した後 3 L のメタノールで溶出した。この溶出液を減圧濃縮後、得られた水層を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧濃縮し褐色シロップ状物質 60 g を得た。

20

培養エキスの一部 ( 30 g ) をクロロホルム - メタノール ( 4 : 1 ) の混合溶媒に溶解し、n - ヘキサンで湿潤させて調製したシリカゲル [ Silica Gel 60 ( 商品名、Merck 社製 ) ] のカラム ( 1600 ml ) に吸着させた。n - ヘキサン - 酢酸エチルの混合溶媒で順次溶出し、n - ヘキサン - 酢酸エチル ( 4 : 1 ) 溶出画分 ( 130 mg )、( 2 : 1 ) 溶出画分 ( 1 ) ( 1.88 g )、( 2 ) ( 780 mg )、( 1 : 2 ) 溶出画分 ( 3.56 g ) を得た。n - ヘキサン - 酢酸エチル ( 4 : 1 ) 溶出画分 ( 130 mg ) を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル - 水 ( pH 3.5、酢酸 ) ( 55 : 45 ) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [ カラム : YMC - Pack Pro C18 AS - 343 ( 20 × 250 mm )、検出 UV 吸収 254 nm、流速 10 ml / min ] にて精製し、2 つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物 63 ( 23.5 mg, 20 min )、化合物 70 ( 4.8 mg, 24 min ) を得た。

30

また n - ヘキサン - 酢酸エチル ( 2 : 1 ) 溶出画分 ( 1 ) ( 1.88 g ) をアセトン ( 30 ml ) で再結晶し、化合物 61 ( 277 mg ) を得、溶出画分 ( 2 ) ( 780 mg ) を分取薄層クロマトグラフィー [ Silica Gel 60 F254 ( 商品名、Merck 社製 )、20 cm × 20 cm、厚さ 1 mm ] にて n - ヘキサン - アセトン ( 3 : 2 ) を展開溶媒として精製し、Rf 値が 0.4 の部分を回収して酢酸エチルで抽出した後、減圧濃縮して化合物 60 ( 80.3 mg ) を得た。次に n - ヘキサン - 酢酸エチル ( 1 : 2 ) 溶出画分 ( 3.56 g ) をクロロホルム - メタノール ( 4 : 1 ) の混合溶媒に溶解し、クロロホルムで湿潤させて調製したシリカゲル [ Silica Gel 60 ( 商品名、Merck 社製 ) ] のカラム ( 880 ml ) に吸着させた。クロロホルム - メタノールの混合溶媒で順次溶出し、クロロホルム - メタノール ( 98 : 2 ) 溶出画分 ( 926 mg ) を得、アセトン - メタノール ( 1 ml / 3 ml ) で再結晶することで化合物 62 ( 339 mg ) を得た。またクロロホルム - メタノール ( 97 : 3 ) 溶出画分 ( 1.42 g ) をセファデックス LH - 20 ( 商品名、アマシャムファルマシアバイオテク社製 ) ( メタノール、900 ml ) のカラムクロマトグラフィー、続いてアセトニトリル - 水 ( pH 3.5、酢酸 ) ( 30 : 70 ) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [ カラム : YM

40

50

C - P a c k P r o C 1 8 A S - 3 4 3 ( 2 0 × 2 5 0 m m )、検出UV吸収 2 5 4 n m、流速 1 0 m l / m i n ]にて精製し、得られた画分を減圧濃縮して、化合物 6 8 ( 4 . 5 m g , 2 1 m i n )を得た。

実施例 3 7 ( 化合物 6 4 , 6 5 , 7 1 , 7 2 , 7 6 )

実施例 3 6 と同様にして得た培養エキスの一部 ( 3 0 g ) をクロロホルム - メタノール ( 4 : 1 ) の混合溶媒に溶解し、クロロホルムで湿潤させて調製したシリカゲル [ S i l i c a G e l 6 0 ( 商品名、M e r c k 社製 ) ] のカラム ( 7 0 0 m l ) に吸着させた。クロロホルム - メタノールの混合溶媒で順次溶出し、クロロホルム - メタノール ( 9 3 : 7 ) 溶出画分を 2 つに分け、画分 ( 1 ) ( 1 5 6 m g )、( 2 ) ( 1 6 4 m g ) とした。画分 ( 1 ) を少量のメタノールに溶解し、アセトニトリル - 水 ( p H 3 . 5、酢酸 ) ( 3 0 : 7 0 ) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [ カラム : Y M C - P a c k P r o C 1 8 A S - 3 4 3 ( 2 0 × 2 5 0 m m )、検出UV吸収 2 5 4 n m、流速 1 0 m l / m i n ]にて精製し、4 つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物 6 4 ( 3 5 . 4 m g , 2 1 m i n )、化合物 7 2 ( 1 3 . 7 m g , 2 7 m i n )、化合物 7 1 ( 6 . 6 m g , 2 9 m i n )、化合物 6 5 ( 4 . 1 m g , 3 3 m i n ) を得た。また画分 ( 2 ) を同条件の分取高速液体クロマトグラフィーにて精製し、得られた画分を分取し減圧濃縮して、化合物 7 1 ( 3 . 7 m g ) とともに化合物 7 6 ( 4 . 5 m g , 2 0 m i n ) を得た。

実施例 3 8 ( 化合物 6 9 , 7 4 )

実施例 3 6 と同様にして得た培養エキス ( 3 9 . 5 g ) を n - ヘキサン ( 3 0 0 m l × 2 ) で溶解し、生成する沈殿を濾過し溶媒を除去した。得られた沈殿 ( 8 . 1 g ) をクロロホルム - メタノール ( 4 : 1 ) の混合溶媒に溶解し、クロロホルムで湿潤させて調製したシリカゲル [ S i l i c a G e l 6 0 ( 商品名、M e r c k 社製 ) ] のカラム ( 6 5 0 m l ) に吸着させた。クロロホルム - メタノールの混合溶媒で順次溶出し、クロロホルム - メタノール ( 8 8 : 1 2 ) 溶出画分 ( 3 1 8 m g ) を得た。得られた画分を少量のメタノールに溶解し、アセトニトリル - 水 ( p H 3 . 5、酢酸 ) ( 3 0 : 7 0 ) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [ カラム : Y M C - P a c k P r o C 1 8 A S - 3 4 3 ( 2 0 × 2 5 0 m m )、検出UV吸収 2 5 4 n m、流速 1 0 m l / m i n ]にて精製し、2 つの画分を分取し各画分を減圧濃縮して、化合物 7 4 ( 1 5 . 3 m g , 1 9 m i n )、化合物 6 9 ( 8 . 0 m g , 3 8 m i n ) を得た。

実施例 3 9 ( 化合物 6 6 )

実施例 3 6 と同様にして得た培養エキス ( 3 9 . 5 g ) を n - ヘキサン ( 3 0 0 m l × 2 ) で溶解し、生成する沈殿を濾過し溶媒を除去した。得られた沈殿 ( 8 . 1 g ) をクロロホルム - メタノール ( 4 : 1 ) の混合溶媒に溶解し、クロロホルムで湿潤させて調製したシリカゲル [ S i l i c a G e l 6 0 ( 商品名、M e r c k 社製 ) ] のカラム ( 6 5 0 m l ) に吸着させた。クロロホルム - メタノールの混合溶媒で順次溶出し、クロロホルム - メタノール ( 1 0 0 : 0 ) 溶出画分 ( 1 . 5 g ) を得た。続いて n - ヘキサン - 酢酸エチルの混合溶媒でシリカゲルカラム ( 6 2 0 m l ) を行い、n - ヘキサン - 酢酸エチル ( 2 : 1 ) 溶出画分 ( 3 2 1 m g ) を得た。得られた画分を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル - 水 ( p H 3 . 5、酢酸 ) ( 4 5 : 5 5 ~ 7 0 : 3 0、グラジエント ) を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー [ カラム : Y M C - P a c k P r o C 1 8 A S - 3 4 3 ( 2 0 × 2 5 0 m m )、検出UV吸収 2 5 4 n m、流速 1 0 m l / m i n ]にて精製し、化合物 6 6 ( 1 4 . 4 m g , 3 4 m i n ) を得た。

実施例 4 0 ( 化合物 7 3 , 7 7 , 7 8 )

実施例 3 6 と同様にして得た培養エキス ( 5 0 0 g ) をクロロホルム - メタノール ( 4 : 1 ) の混合溶媒に溶解し、クロロホルムで湿潤させて調製したシリカゲル [ S i l i c a G e l 6 0 ( 商品名、M e r c k 社製 ) ] のカラム ( 6 0 0 0 m l ) に吸着させた。クロロホルム - メタノールの混合溶媒で順次溶出し、クロロホルム - メタノール ( 9 5 : 5 ) 溶出画分 ( 5 7 g ) を得、その一部 ( 1 8 g ) をさらに n - ヘキサン - 酢酸エチルの混合溶媒でシリカゲルカラム ( 8 0 0 m l ) を行い、n - ヘキサン - 酢酸エチル ( 2 : 1

10

20

30

40

50

）溶出画分を2つに分け、画分（1）（126mg）、（2）（985mg）とした。画分（1）を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル-水（pH3.5、酢酸）（55：45）を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー〔カラム：YMC-Pack Pro C18 AS-343（20×250mm）、検出UV吸収254nm、流速10ml/min〕にて精製し、得られた画分を減圧濃縮して、化合物78（13.4mg，26min）を得た。また画分（2）を移動層をアセトニトリル-水（pH3.5、酢酸）（45：55）とした分取高速液体クロマトグラフィーにて精製し、2つの画分を分取しそれぞれ減圧濃縮して、化合物73（38.1mg，10min）、化合物77（67.2mg，26min）を得た。

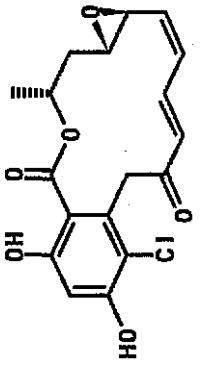
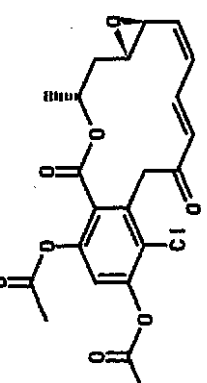
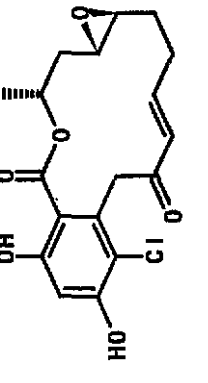
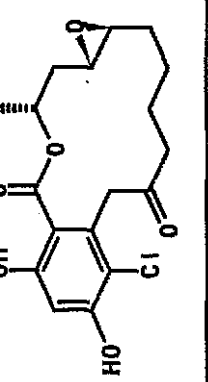
実施例41（化合物67，75）

実施例36と同様にして得た培養エキス（500g）をクロロホルム-メタノール（4：1）の混合溶媒に溶解し、クロロホルムで湿潤させて調製したシリカゲル〔Silica Gel 60（商品名、Merck社製）〕のカラム（6000ml）に吸着させた。クロロホルム-メタノールの混合溶媒で順次溶出し、クロロホルム-メタノール（95：5）溶出画分（57g）を得、その一部（18g）をさらにn-ヘキサン-酢酸エチルの混合溶媒でシリカゲルカラム（800ml）を行い、n-ヘキサン-酢酸エチル（1：2）溶出画分（890mg）を得た。得られた画分を少量のアセトンに溶解し、アセトニトリル-水（pH3.5、酢酸）（40：60）を移動層とした分取高速液体クロマトグラフィー〔カラム：YMC-Pack Pro C18 AS-343（20×250mm）、検出UV吸収254nm、流速10ml/min〕にて精製し、2つの画分を分取し得られた画分を減圧濃縮して、化合物67（17.4mg，11min）とともにセミピュアサンプル（23.9mg）を得た。セミピュアサンプルを分取薄層クロマトグラフィー〔Silica Gel 60 F254（商品名、Merck社製）、20cm×20cm、厚さ0.5mm〕にてクロロホルム-メタノール（90：10）を展開溶媒として精製し、Rf値が0.5の部分を回収して酢酸エチルで抽出後、減圧濃縮して化合物75（4.3mg）を得た。

上記実施例にて合成した化合物及び精製した化合物並びにそのデータを表2に示す。

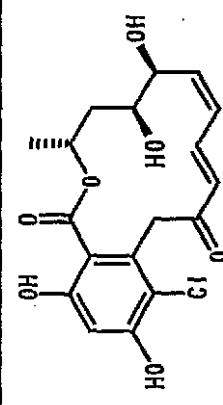
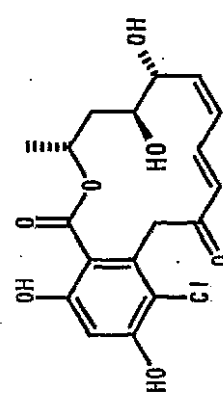
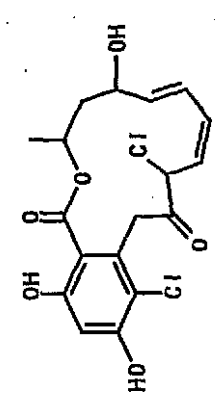
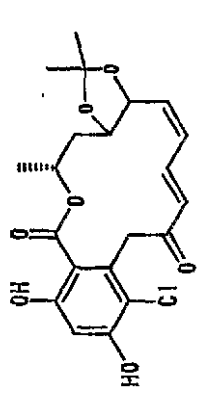
10

20

化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
1		<p>(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) δppm: 1.48(d, J=6.7Hz, 3H), 1.83(ddd, J=15.3, 9.6, 3.7Hz, 1H), 2.33(dt, J=15.3, 3.7Hz, 1H), 2.94(dt, J=9.6, 3.0Hz, 1H), 3.19(s, 1H), 3.86(d, J=16.5Hz, 1H), 4.51(d, J=16.5Hz, 1H), 5.41(sxt, J=3.7Hz, 1H), 5.78(ddd, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 6.05(d, J=15.9Hz, 1H), 6.15(t, J=9.8Hz, 1H), 6.45(s, 1H), 7.48(dd, J=15.9, 9.8Hz, 1H)</p>	<p>(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 125MHz) δppm: 18.5(q), 36.3(t), 46.3(t), 55.8(d), 56.1(d), 71.2(d), 103.4(d), 108.0(s), 116.1(s), 130.1(d), 130.5(d), 135.0(d), 135.7(s), 139.6(d), 158.2(s), 161.2(s), 168.9(s), 199.1(s)</p>
2		<p>(CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δppm: 1.51(d, J=6.7Hz, 3H), 1.54(ddd, J=14.6, 8.5, 3.7Hz, 1H), 2.24(s, 3H), 2.31(s, 3H), 2.38(dt, J=14.6, 3.7Hz, 1H), 2.99(dt, J=8.5, 3.7Hz, 1H), 3.49(qui, J=1.8Hz, 1H), 3.91(d, J=15.9Hz, 1H), 4.04(d, J=15.9Hz, 1H), 5.37(dq, J=6.7, 3.7Hz, 1H), 5.74(dd, J=11.0, 3.7Hz, 1H), 6.03(d, J=16.5Hz, 1H), 6.12(t, J=11.0Hz, 1H), 7.02(s, 1H), 7.45(dd, J=16.5, 11.0Hz, 1H)</p>	<p>(CDCl<sub>3</sub>, 125MHz) δppm: 18.6(q), 20.6(q), 20.7(q), 37.1(c), 45.1(t), 55.0(d), 55.4(d), 70.8(d), 117.8(d), 126.3(s), 126.5(s), 129.9(d), 130.6(d), 133.6(s), 136.1(d), 139.1(d), 146.6(s), 148.7(s), 163.8(s), 167.5(s), 168.1(s), 195.6(s)</p>
3		<p>(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) δppm: 1.21(m, 1H), 1.41(d, J=6.1Hz, 3H), 1.81(dt, J=15.9, 4.3Hz, 1H), 1.97(ddd, J=15.9, 4.9, 2.4Hz, 1H), 2.23(m, 1H), 2.35(ddd, J=14.0, 7.3, 2.4Hz, 1H), 2.48(dd, J=7.3, 3.7Hz, 1H), 2.52(dt, J=9.8, 2.4Hz, 1H), 2.74(sxt, J=2.4Hz, 1H), 4.27(d, J=18.3Hz, 1H), 4.40(d, J=18.3Hz, 1H), 5.21(dq, J=6.1, 4.3Hz, 1H), 6.05(dd, J=15.9, 1.2Hz, 1H), 6.48(s, 1H), 6.85(ddd, J=15.9, 11.0, 4.3Hz, 1H)</p>	<p>(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 125MHz) δppm: 17.8(q), 29.2(t), 30.9(t), 36.4(t), 45.1(t), 56.0(d), 57.6(d), 72.1(d), 103.5(d), 106.3(s), 116.3(s), 130.1(d), 136.1(s), 148.0(d), 158.8(s), 163.4(s), 170.3(s), 197.0(s)</p>
4		<p>(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) δppm: 1.02(m, 1H), 1.32(d, J=6.4Hz, 3H), 1.36(m, 1H), 1.41(m, 2H), 1.64(m, 1H), 1.77(ddd, J=15.5, 6.4, 2.7Hz, 1H), 1.92(ddd, J=14.0, 7.0, 3.0Hz, 1H), 2.04(ddd, J=15.5, 5.4, 3Hz, 1H), 2.34(m, 2H), 2.53(dt, J=8.8, 3.0Hz, 1H), 2.68(m, 1H), 4.02(d, J=18.3Hz, 1H), 4.25(d, J=18.3Hz, 1H), 5.15(d'qui, J=6.4, 2.7Hz, 1H), 6.37(s, 1H)</p>	<p>(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 125MHz) δppm: 18.6(q), 22.1(t), 23.2(t), 30.8(t), 36.1(t), 40.3(t), 46.5(t), 54.8(d), 57.6(d), 70.8(d), 103.1(d), 106.4(s), 115.6(s), 135.6(s), 158.2(s), 162.2(s), 169.6(s), 208.0(s)</p>

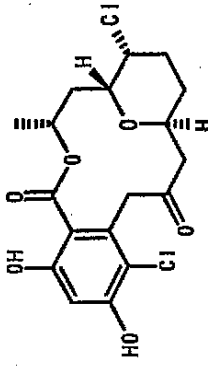
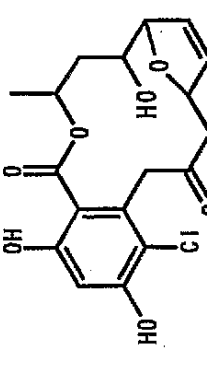
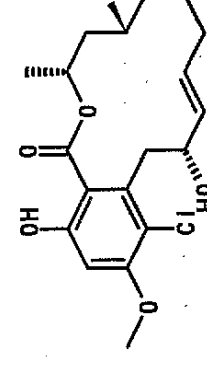
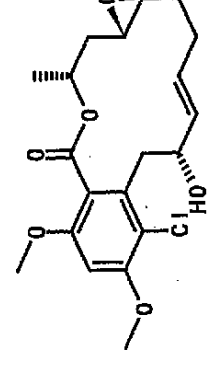
化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
5		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.41(d, J=6.7Hz, 3H), 1.95(ddd, J=16.1, 5.5Hz, 1H), 2.50(ddd, J=16.1, 7.6, 3.0Hz, 1H), 2.97(qui, J=3.0Hz, 1H), 3.18(ddd, J=12.8, 4.0Hz, 1H), 3.28(m, 1H), 3.73(ddd, J=12.8, 10.4Hz, 1H), 4.52(sep, J=4.0Hz, 1H), 5.21(m, 1H), 5.31(ddd, J=11.3, 5.5Hz, 1H), 5.78~5.90(m, 3H), 6.35(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.1(q), 36.0(t), 40.0(t), 56.0(d), 57.2(d), 70.3(d), 72.7(d), 103.5(d), 108.6(s), 115.9(s), 127.4(d), 129.3(d), 130.7(d), 139.0(s), 139.1(d), 159.0(s), 162.8(s), 171.2(s)
7		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.19(m, 1H), 1.35(d, J=6.7Hz, 3H), 1.85(ddd, J=15.5, 5.5, 2.4Hz, 1H), 1.95(m, 1H), 2.01(m, 1H), 2.16(m, 1H), 2.27(ddd, J=15.5, 6.7, 3.0Hz, 1H), 2.50(dt, J=9.1, 3.0Hz, 1H), 2.85(qui, J=3.0Hz, 1H), 3.23(ddd, J=12.5, 5.5Hz, 1H), 3.63(ddd, J=12.5, 9.4Hz, 1H), 4.33(qui, J=5.5Hz, 1H), 5.07(d' qui, J=6.7, 2.4Hz, 1H), 5.28(ddd, J=15.5, 5.5Hz, 1H), 5.38(ddd, J=15.5, 12.5, 5.5, 1H), 6.32(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.2(q), 29.5(t), 31.3(t), 37.0(t), 40.2(t), 58.3(d), 59.6(d), 70.9(d), 71.8(d), 103.4(d), 109.3(d), 115.9(d), 129.1(d), 133.2(d), 140.0(d), 159.2(s), 163.0(s), 171.8(s)
8		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.27(m, 1H), 1.35(d, J=6.1Hz, 3H), 2.02(m, 1H), 2.03(m, 1H), 2.05(m, 1H), 2.17(m, 1H), 2.20(m, 1H), 2.86(ddd, J=5.8, 3.0Hz, 1H), 2.92(dt, J=8.5, 3.0Hz, 1H), 3.25(ddd, J=12.8, 5.5Hz, 1H), 3.30(ddd, J=12.8, 9.8Hz, 1H), 4.43(m, 1H), 4.93(d' sxt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 5.37(ddd, J=15.5, 4.0Hz, 1H), 5.64(dt, J=15.5, 6.1Hz, 1H), 6.41(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.4(q), 28.8(t), 31.2(t), 36.8(t), 39.7(t), 56.8(d), 57.6(d), 69.5(d), 70.6(d), 103.3(d), 114.7(s), 114.9(s), 129.7(d), 133.4(d), 138.5(s), 157.3(s), 158.2(s), 169.5(s)
9		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.11(m, 1H), 1.43(m, 1H), 1.45(d, J=6.4Hz, 3H), 1.48(m, 1H), 1.52(m, 1H), 1.57(m, 1H), 1.74(ddd, J=15.5, 7.3, 2.4Hz, 1H), 2.09(c' qui, J=14.3, 2.4Hz, 1H), 2.36(ddd, J=15.5, 7.3, 2.4Hz, 1H), 2.71(dt, J=9.4, 2.4Hz, 1H), 3.03(dt, J=7.3, 2.4Hz, 1H), 3.21(ddd, J=7.3, 1.8Hz, 2H), 3.88(m, 1H), 5.20(d' qui, J=6.4, 2.4Hz, 1H), 6.38(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.0(q), 25.2(t), 25.8(t), 32.2(t), 36.8(t), 38.0(t), 39.9(t), 58.2(d), 60.5(d), 71.4(d), 72.8(d), 103.0(d), 112.3(s), 115.3(s), 139.7(s), 158.0(s), 160.1(s), 171.1(s)

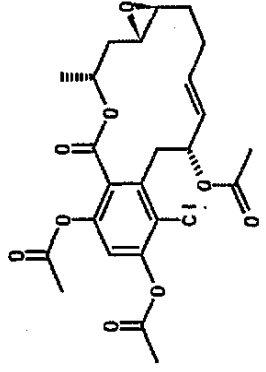
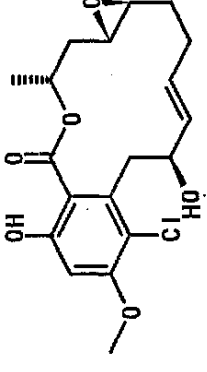
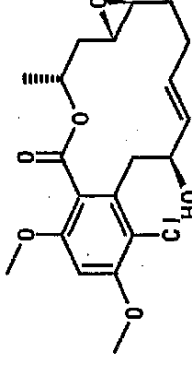
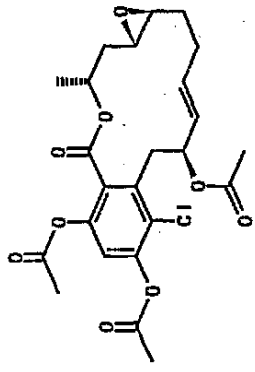
化合物番号	構造	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
10		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.29(m, 1H), 1.35(m, 2H), 1.38(m, 2H), 1.40(d, J=6.1Hz, 3H), 1.50(m, 1H), 1.57(m, 1H), 1.94(m, 1H), 2.37(m, 1H), 2.81(dt, J=7.3, 2.4Hz, 1H), 2.88(dt, J=7.3, 2.4Hz, 1H), 2.98(dd, J=13.4, 5.5Hz, 1H), 3.15(dd, J=13.4, 7.2Hz, 1H), 3.82(qui, J=6.1Hz, 1H), 5.12(d'ext, J=6.1, 2.4Hz, 1H), 6.39(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 20.5(q), 23.5(t), 24.6(t), 30.2(t), 35.1(t), 37.8(t), 39.2(t), 57.1(d), 59.1(d), 72.2(d), 72.3(d), 102.9(d), 114.6(s), 115.9(s), 138.5(s), 156.6(s), 156.8(s), 169.8(s)
11		(CDCl3, 500MHz) δppm: 1.50(d, J=6.7Hz, 3H), 1.61(ddd, J=14.6, 8.6, 3.7Hz, 1H), 2.40(dt, J=14.6, 3.7Hz, 1H), 3.02(dt, J=8.6, 1.8Hz, 1H), 3.40(br.t, J=1.8Hz, 1H), 3.75(d, J=15.9Hz, 1H), 3.89(s, 3H), 3.89(s, 3H), 3.95(d, J=15.9Hz, 1H), 5.35(dq, J=6.7, 3.7Hz, 1H), 5.69(dd, J=10.4, 4.3Hz, 1H), 6.07(d, J=15.9Hz, 1H), 6.12(t, J=10.4Hz, 1H), 6.45(s, 1H), 7.48(dd, J=15.9, 10.4Hz, 1H)	(CDCl3, 125MHz) δppm: 18.6(q), 37.3(t), 45.2(t), 55.5(d), 56.6(d), 56.3(q), 56.4(q), 70.2(d), 95.5(d), 115.5(s), 117.9(s), 130.2(d), 131.0(d), 132.4(s), 135.6(d), 138.6(d), 156.3(s), 156.9(s), 166.0(s), 196.4(s)
12		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.42(d, J=6.4Hz, 3H), 1.89(ddd, J=15.2, 9.1, 3.6Hz, 1H), 2.03(dd, J=15.2, 7.0Hz, 1H), 3.66(d, J=16.2Hz, 1H), 3.99(dd, J=9.1, 5.8Hz, 1H), 4.21(d, J=16.2Hz, 1H), 5.12(dd, J=10.0, 5.8Hz, 1H), 5.38(dq, J=6.4, 3.6Hz, 1H), 5.75(t, J=10.0Hz, 1H), 5.95(d, J=16.1Hz, 1H), 6.17(t, J=11.0Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 7.21(dd, J=16.1, 11.0Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 19.3(q), 38.2(t), 45.7(t), 60.6(d), 70.9(d), 72.6(d), 103.9(d), 114.3(s), 116.3(s), 130.8(d), 132.6(d), 134.6(s), 138.1(d), 141.1(d), 156.9(s), 157.0(s), 168.1(s), 199.8(s)
13		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.46(d, J=6.1Hz, 3H), 1.96(ddd, J=14.0, 10.4, 3.0Hz, 1H), 2.12(ddd, J=14.0, 9.8, 3.0Hz, 1H), 3.76(d, J=15.3Hz, 1H), 3.88(dt, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 4.73(d, J=15.3Hz, 1H), 5.00(dd, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 5.27(m, 1H), 6.00(d, J=15.9Hz, 1H), 6.02(t, J=9.8Hz, 1H), 6.14(t, J=9.8Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 7.18(dd, J=15.9, 9.8Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 20.8(q), 40.6(t), 44.5(t), 60.4(d), 71.0(d), 72.1(d), 104.1(d), 113.8(s), 115.7(s), 127.6(d), 131.7(d), 135.4(s), 138.6(d), 139.1(d), 157.8(s), 158.6(s), 168.5(s), 198.7(s)

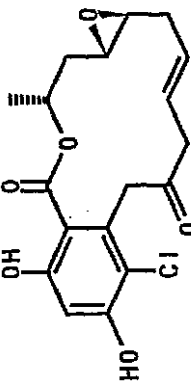
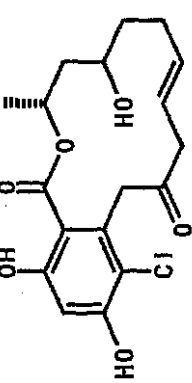
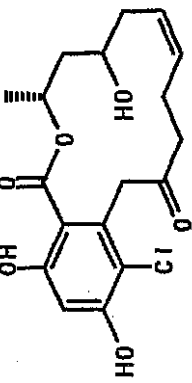
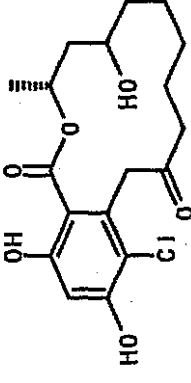
化合物 番号	構造	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
14		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.42(d, J=6.7Hz, 3H), 1.87(ddd, J=15.3, 9.2, 3.7Hz, 1H), 1.95(ddd, J=15.3, 6.7Hz, 1H), 3.03(d, J=15.9Hz, 1H), 3.80(m, 1H), 4.18(d, J=15.9Hz, 1H), 4.78(ddd, J=8.5, 6.1Hz, 1H), 5.40(m, 1H), 5.73(ddd, J=11.0, 8.5Hz, 1H), 5.90(d, J=15.9Hz, 1H), 6.14(t, J=11.0Hz, 1H), 6.41(s, 1H), 7.30(ddd, J=15.9, 11.0Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 19.4(q), 37.8(t), 45.8(t), 71.2(d), 71.9(d), 72.0(d), 103.8(d), 114.3(s), 116.6(s), 130.0(d), 131.5(d), 134.7(s), 142.4(d), 142.9(d), 156.7(s), 156.9(s), 168.4(s), 200.2(s)
15		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.44(d, J=6.1Hz, 3H), 1.83(ddd, J=14.6, 9.8, 3.0Hz, 1H), 2.10(ddd, J=14.6, 9.8, 3.0Hz, 1H), 3.64(dt, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 3.87(d, J=15.9Hz, 1H), 4.53(d, J=15.9Hz, 1H), 4.56(m, 1H), 5.45(m, 1H), 5.94(ddd, J=10.4, 7.3Hz, 1H), 5.96(d, J=15.9Hz, 1H), 6.12(t, J=10.4Hz, 1H), 6.44(s, 1H), 7.36(ddd, J=15.9, 10.4Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 21.0(q), 39.3(t), 44.5(t), 69.5(d), 71.2(d), 72.7(d), 104.0(d), 113.0(s), 115.9(s), 127.2(d), 131.3(d), 135.8(s), 140.6(d), 143.7(d), 158.2(s), 158.9(s), 168.7(s), 199.5(s)
16		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.29(d, J=6.1Hz, 3H), 1.70(ddd, J=11.6, 10.4, 2.4Hz, 1H), 2.17(dt, J=11.6, 6.1Hz, 1H), 4.01(d, J=18.9Hz, 1H), 4.05(m, 1H), 4.34(d, J=18.9Hz, 1H), 5.01(m, 1H), 5.46(d, J=9.8Hz, 1H), 5.82(ddd, J=15.3, 9.8Hz, 1H), 6.02(t, J=11.0Hz, 1H), 6.10(ddd, J=15.3, 11.0Hz, 1H), 6.30(t, J=11.0Hz, 1H), 6.45(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 20.6(q), 42.3(t), 42.4(t), 62.9(d), 70.4(d), 71.5(d), 103.8(d), 115.0(s), 116.4(s), 126.2(d), 127.6(d), 133.4(s), 134.8(d), 140.8(d), 156.5(s), 156.6(s), 169.4(s), 201.0(s)
17		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.38(s, 3H), 1.39(s, 3H), 1.46(d, J=6.4Hz, 3H), 1.87(ddd, J=16.1, 9.1Hz, 1H), 2.08(ddd, J=16.1, 5.8, 1.8Hz, 1H), 3.73(ddd, J=9.1, 5.8Hz, 1H), 3.85(d, J=16.4Hz, 1H), 4.38(d, J=16.4Hz, 1H), 4.71(t, J=9.1Hz, 1H), 5.65(m, 1H), 5.78(ddd, J=11.3, 9.1Hz, 1H), 6.03(d, J=16.1Hz, 1H), 6.32(t, J=11.3Hz, 1H), 6.47(s, 1H), 7.83(ddd, J=16.1, 11.3Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 21.8(q), 27.2(q), 27.3(q), 34.5(t), 45.9(t), 70.3(d), 75.9(d), 78.9(d), 103.8(d), 110.1(s), 111.0(s), 116.2(s), 130.3(d), 131.3(d), 136.6(s), 138.7(d), 142.2(d), 158.8(s), 160.3(s), 169.1(s), 200.4(s)

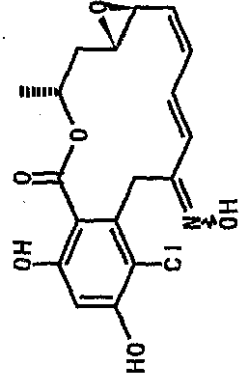
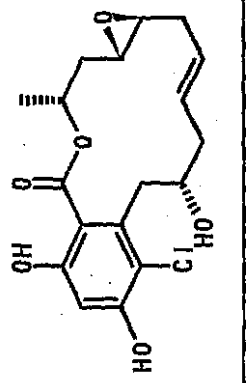
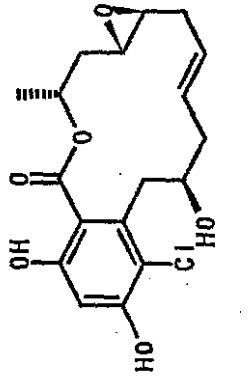
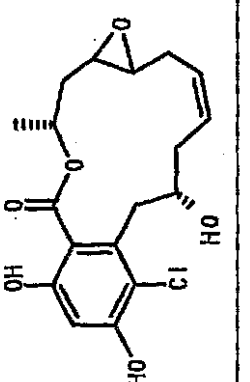
化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
18		(CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD, 500MHz) δppm: 1.52(d, J=6.4Hz, 3H), 2.02(ddd, J=14.9, 9.1, 4.0Hz, 1H), 2.09(ddd, J=14.9, 6.4Hz, 1H), 3.79(d, J=16.1Hz, 1H), 4.20(d, J=16.1Hz, 1H), 5.23(ddd, J=10.0, 5.8Hz, 1H), 5.34(dt, J=6.4, 4.0Hz, 1H), 5.39(ddd, J=8.5, 5.8Hz, 1H), 5.73(t, J=10.0Hz, 1H), 6.00(d, J=16.1Hz, 1H), 6.16(t, J=11.0Hz, 1H), 6.48(s, 1H), 7.18(ddd, J=16.1, 11.0Hz, 1H), 8.02(s, 1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD, 125MHz) δppm: 19.0(q), 35.4(t), 45.4(t), 56.8(d), 70.0(d), 73.3(d), 103.6(d), 114.0(s), 115.1(s), 130.9(d), 133.1(d), 133.6(s), 135.6(d), 139.2(d), 156.3(s), 156.4(s), 160.6(d), 167.3(s), 198.8(s)
19		(DMSO-d <sub>6</sub> , 500MHz) δppm: 1.25(d, J=6.1Hz, 3H), 1.74(ddd, J=15.3, 10.4, 7.9Hz, 1H), 2.01(d, J=15.3Hz, 1H), 2.49(ddd, J=14.6, 3.0Hz, 1H), 3.11(ddd, J=14.6, 12.2Hz, 1H), 3.81(t, J=7.9Hz, 1H), 3.92(d, J=17.7Hz, 1H), 3.97(d, J=17.7Hz, 1H), 4.39(ddd, J=7.9, 1.8Hz, 1H), 4.61(q, J=12.2Hz, 1H), 5.11(m, 1H), 5.63(dt, J=10.4, 1.8Hz, 1H), 5.91(dt, J=10.4, 1.8Hz, 1H), 6.47(s, 1H), 9.97(br.s, 1H), 10.35(br.s, 1H)	(DMSO-d <sub>6</sub> , 125MHz) δppm: 20.8(q), 37.8(t), 43.3(t), 46.0(t), 56.1(d), 69.2(d), 72.1(d), 72.6(d), 102.2(d), 112.3(s), 115.0(s), 126.9(d), 131.6(d), 131.8(s), 154.0(s), 154.7(s), 167.2(s), 202.8(s)
20		(CDCl <sub>3</sub> , 500MHz) δppm: 1.40(d, J=6.4Hz, 3H), 1.77(ddd, J=10.4, 7.9, 1.5Hz, 1H), 1.91(m, 1H), 2.04(m, 1H), 2.13(m, 1H), 2.23(ddd, J=12.5, 7.3Hz, 1H), 2.42(ddd, J=14.6, 4.9Hz, 1H), 2.73(ddd, J=15.5, 11.3Hz, 1H), 3.04(ddd, J=14.6, 4.6Hz, 1H), 3.30(t, J=10.0Hz, 1H), 3.91(ddd, J=10.4, 7.9, 1.5Hz, 1H), 4.13(d, J=18.3Hz, 1H), 4.42(sxt, J=4.6Hz, 1H), 4.94(d, J=18.3Hz, 1H), 5.28(sxt, J=6.4Hz, 1H), 6.60(s, 1H), 11.9(br.s, 1H)	(CDCl <sub>3</sub> , 125MHz) δppm: 20.6(q), 27.2(t), 28.7(t), 42.5(t), 45.3(t), 50.4(t), 58.6(d), 72.3(d), 78.1(d), 81.3(d), 103.8(d), 107.4(s), 114.5(s), 135.8(s), 156.3(s), 164.1(s), 170.3(s), 206.1(s)
21		(CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD, 500MHz) δppm: 1.20(d, J=6.1Hz, 3H), 1.41(m, 1H), 1.66(m, 1H), 1.70(m, 1H), 1.75(m, 1H), 2.13(d, J=13.4Hz, 1H), 2.16(ddd, J=11.0, 2.7Hz, 1H), 2.22(m, 1H), 2.57(t, J=11.0Hz, 1H), 3.28(t, J=9.8Hz, 1H), 3.42(ddd, J=11.6, 9.8, 4.6Hz, 1H), 3.51(dt, J=11.0, 2.7Hz, 1H), 4.13(d, J=19.2Hz, 1H), 5.05(d' sxt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 5.31(br.d, J=19.2Hz, 1H), 6.33(s, 1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD, 125MHz) δppm: 20.8(q), 32.4(t), 34.1(t), 37.9(t), 47.3(t), 47.9(t), 57.5(d), 74.4(d), 76.2(d), 81.7(d), 102.8(d), 107.6(s), 115.0(s), 134.7(s), 157.3(s), 161.3(s), 170.5(s), 207.0(s)

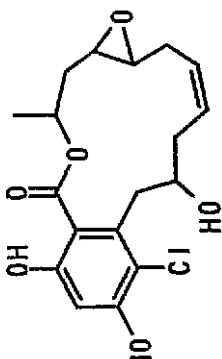
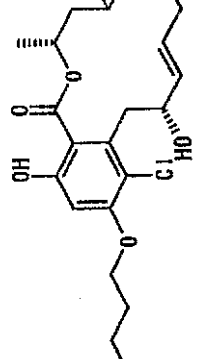
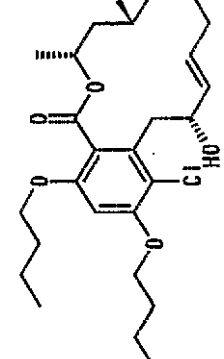


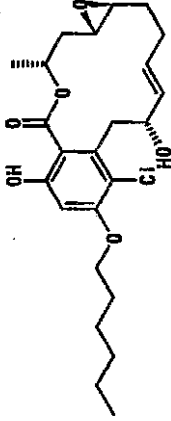
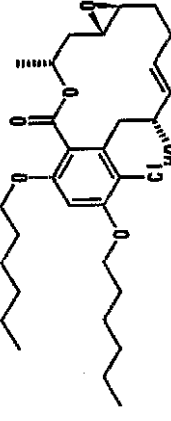
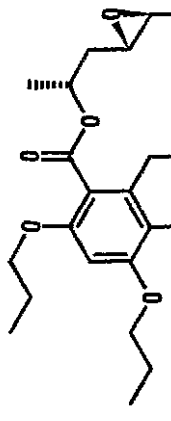
化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
22		(CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD, 500MHz) δppm: 1.30(d, J=6.1Hz, 3H), 1.75(dd, J=11.6, 5.5Hz, 1H), 1.80(d, J=14.6Hz, 1H), 1.99(m, 1H), 2.18(m, 2H), 2.54(br.s, 2H), 2.85(br.s, 2H), 3.82(m, 1H), 3.91(br.s, 1H), 4.42(br.s, 1H), 5.15(m, 1H), 6.43(s, 1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD, 125MHz) δppm: 21.4(q), 27.0(t), 28.7(t), 35.8(t), 46.9(t), 46.9(t), 58.6(d), 68.2(d), 74.1(d), 77.0(d), 103.2(d), 107.0(s), 115.5(s), 134.8(s), 158.0(s), 162.1(s), 170.9(s), 205.0(s)
23		(DMSO-d <sub>6</sub> , 500MHz) δppm: 1.26(d, J=6.7Hz, 3H), 1.44(ddd, J=14.6, 7.9, 3.0Hz, 1H), 2.16(d, J=12.8Hz, 1H), 2.37(dd, J=14.6, 5.5Hz, 1H), 2.76(dd, J=14.6, 4.9Hz, 1H), 3.20(m, 1H), 3.71(q, J=18.3Hz, 1H), 3.90(d, J=18.3Hz, 1H), 4.21(dt, J=9.8, 1.8Hz, 1H), 4.88(d, J=6.7Hz, 1H), 5.01(br.s, 1H), 5.20(sep, J=3.7Hz, 1H), 5.89(dt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 6.00(dt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 6.50(s, 1H), 9.97(s, 1H), 10.47(br.s, 1H)	(DMSO-d <sub>6</sub> , 125MHz) δppm: 19.2(q), 37.6(t), 45.1(t), 48.3(t), 69.7(d), 70.3(d), 83.3(d), 88.4(d), 102.4(d), 111.7(s), 115.3(s), 129.3(d), 130.0(d), 130.2(s), 154.4(s), 154.7(s), 166.4(s), 203.8(s)
25		(Acetone-d <sub>6</sub> , 500MHz) δppm: 1.22(dt, J=17.0, 9.1Hz, 1H), 1.43(d, J=6.7Hz, 3H), 1.98(m, 1H), 2.00(m, 1H), 2.06(m, 1H), 2.21(m, 1H), 2.33(ddd, J=15.8, 7.0, 3.0Hz, 1H), 2.50(dt, J=9.4, 1.8Hz, 1H), 2.83(m, 1H), 3.35(dd, J=12.5, 6.1Hz, 1H), 3.89(dd, J=12.5, 9.8Hz, 1H), 3.94(s, 3H), 4.43(m, 1H), 5.16(d-qui, J=6.7, 2.4Hz, 1H), 5.36(dd, J=15.2, 4.3Hz, 1H), 5.53(ddd, J=15.2, 6.7, 4.3, 1.8Hz, 1H), 6.58(s, 1H)	(Acetone-d <sub>6</sub> , 125MHz) δppm: 20.2(q), 29.3(t), 31.1(t), 36.5(t), 40.3(t), 56.9(q), 57.2(d), 58.3(d), 70.6(d), 70.7(d), 100.2(d), 108.0(s), 116.4(s), 127.9(d), 133.4(d), 140.4(s), 160.4(s), 164.5(s), 171.8(s)
26		(Acetone-d <sub>6</sub> , 500MHz) δppm: 1.09(m, 1H), 1.40(ddd, J=14.6, 8.6, 3.0Hz, 1H), 1.46(d, J=6.7Hz, 3H), 2.10-2.20(m, 3H), 2.31(ddd, J=14.6, 6.7, 3.7Hz, 1H), 2.69(dt, J=9.2, 1.8Hz, 1H), 2.73(dd, J=13.4, 5.5Hz, 1H), 2.83(ddd, J=8.6, 3.7, 1.8Hz, 1H), 3.28(dd, J=13.4, 6.7Hz, 1H), 3.84(s, 3H), 3.94(s, 3H), 4.49(dd, J=13.4, 6.7Hz, 1H), 5.18(d-qui, J=6.7, 3.0Hz, 1H), 5.52(dd, J=15.9, 6.7Hz, 1H), 5.58(m, 1H), 6.75(s, 1H)	(Acetone-d <sub>6</sub> , 125MHz) δppm: 19.8(q), 28.7(t), 33.3(t), 39.0(t), 40.8(t), 56.1(d), 56.7(q), 56.8(q), 58.0(d), 71.5(d), 73.0(d), 96.5(d), 115.1(s), 119.9(s), 130.2(d), 135.7(d), 136.1(s), 156.9(s), 157.4(s), 167.2(s)

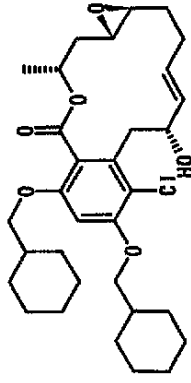
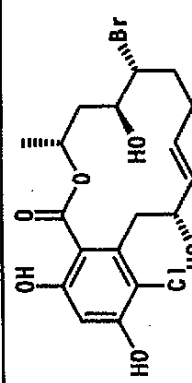
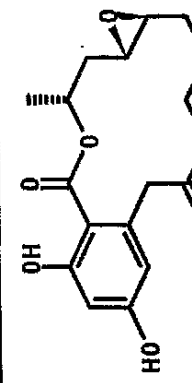
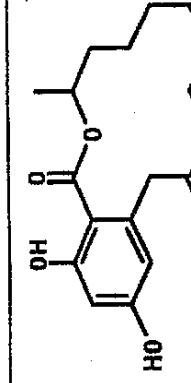
化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
27		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.15(m, 1H), 1.47(d, J=6.7Hz, 3H), 1.48(ddd, J=15.3, 7.9, 3.0Hz, 1H), 1.94(s, 3H), 2.13-2.23(m, 3H), 2.23(s, 3H), 2.30(ddd, J=5.3, 7.9, 4.3Hz, 1H), 2.34(s, 3H), 2.71(dt, J=9.2, 2.4Hz, 1H), 2.88(ddd, J=7.9, 3.7, 1.8Hz, 1H), 3.05(dd, J=14.0, 4.9Hz, 1H), 3.51(ddd, J=14.0, 7.9Hz, 1H), 5.30(d-qui, J=6.7, 2.4Hz, 1H), 5.53(dd, J=14.6, 7.3Hz, 1H), 5.55(m, 1H), 5.74(dt, J=14.6, 6.7Hz, 1H), 7.16(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 19.8(q), 20.4(q), 20.6(q), 20.9(q), 28.0(t), 32.9(t), 37.4(t), 38.9(t), 56.2(d), 57.7(d), 72.8(d), 74.7(d), 118.6(d), 126.0(s), 129.0(s), 130.0(d), 134.1(d), 136.1(s), 147.6(s), 149.2(s), 165.5(s), 168.4(s), 168.7(s), 169.9(s)
28		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.17(d, J=6.1Hz, 3H), 1.53(dt, J=14.0, 5.5Hz, 1H), 1.62(m, 2H), 1.66(dd, J=14.0, 6.7Hz, 1H), 2.25(m, 2H), 2.68(dt, J=5.5, 2.4Hz, 1H), 2.80(m, 1H), 2.99(dd, J=17.1, 10.4Hz, 1H), 3.28(dd, J=17.1, 3.7Hz, 1H), 3.92(qui, J=6.1Hz, 1H), 3.98(s, 3H), 5.13(ddd, J=10.4, 3.7, 3.0Hz, 1H), 5.76(dd, J=15.3, 6.7Hz, 1H), 6.02(dt, J=15.3, 6.7Hz, 1H), 6.60(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 23.9(q), 29.4(t), 31.5(t), 32.1(t), 42.3(t), 56.6(d), 57.1(q), 58.0(d), 65.8(d), 79.3(d), 99.9(d), 102.9(s), 112.0(s), 128.2(d), 135.8(d), 138.9(s), 162.1(s), 164.0(s), 170.0(s)
29		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.22(m, 1H), 1.33(d, J=6.1Hz, 3H), 1.93(m, 1H), 1.96(m, 2H), 2.15(ddd, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 2.18(m, 1H), 2.76(dd, J=5.5, 3.7Hz, 1H), 2.84(dt, J=7.9, 2.4Hz, 1H), 3.09(dd, J=12.8, 10.4Hz, 1H), 3.18(dd, J=12.8, 4.3Hz, 1H), 3.88(s, 3H), 3.96(s, 3H), 4.52(m, 1H), 4.81(qui, J=6.1Hz, 1H), 5.32(ddd, J=16.5, 3.0, 1.2Hz, 1H), 5.72(m, 1H), 6.78(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.4(q), 28.6(t), 30.8(t), 36.7(t), 40.4(t), 55.3(d), 56.4(d), 56.7(q), 56.8(q), 68.6(d), 69.4(d), 96.8(d), 115.6(s), 118.9(s), 128.8(d), 133.2(d), 137.1(s), 158.0(s), 158.6(s), 167.7(s)
30		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.27(m, 1H), 1.40(d, J=6.7Hz, 3H), 1.96(m, 1H), 1.98(s, 3H), 2.03-2.10(m, 3H), 2.11(m, 1H), 2.27(s, 3H), 2.34(s, 3H), 2.75(dt, J=7.9, 2.4Hz, 1H), 2.81(m, 1H), 3.35(dd, J=14.0, 6.7Hz, 1H), 3.55(dd, J=14.0, 8.5Hz, 1H), 5.09(d-qui, J=6.7, 2.4Hz, 1H), 5.42(dd, J=15.9, 4.9Hz, 1H), 5.57(dd, J=12.8, 6.7Hz, 1H), 5.69(ddd, J=15.9, 6.7, 1.2Hz, 1H), 7.18(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 19.8(q), 20.4(q), 20.9(q), 20.9(q), 27.5(t), 30.9(t), 36.3(t), 37.2(t), 55.4(d), 56.1(d), 71.2(d), 71.2(d), 119.2(d), 126.6(s), 128.1(s), 128.5(d), 133.2(d), 136.9(s), 148.7(s), 149.7(s), 165.2(s), 168.3(s), 169.0(s), 169.7(s)

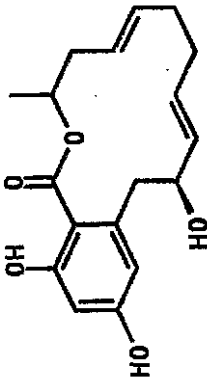
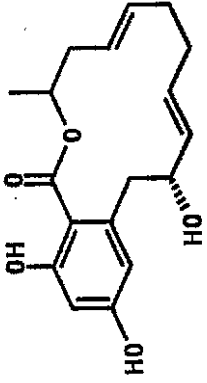
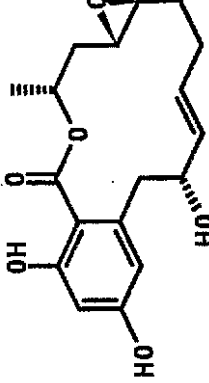
化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
31		<p>(CDC13/CD3OD,500MHz) <math>\delta</math>ppm: 1.31(d,J=6.7Hz,3H), 1.66(m,2H), 2.10(ddd,J=14.6,4.9,3.7,3.0Hz,1H), 2.53(ddd,J=14.0,6.7,3.7Hz,1H), 2.60(dt,J=7.9,3.0Hz,1H), 2.69(dt,J=9.2,3.0Hz,1H), 2.81(dd,J=12.2,7.3Hz,1H), 3.14(dd,J=12.2,7.9Hz,1H), 4.06(d,J=18.3Hz,1H), 4.22(d,J=18.3Hz,1H), 5.18(m,1H), 5.28(ddd,J=15.3,7.3,6.7Hz,1H), 5.40(ddd,J=15.3,7.9,7.3Hz,1H), 6.38(s,1H)</p>	<p>(CDC13/CD3OD,125MHz) <math>\delta</math>ppm: 18.9(q), 33.8(t), 36.2(t), 45.4(t), 45.8(t), 53.7(d), 58.2(d), 71.5(d), 103.1(d), 107.6(s), 115.6(s), 125.9(d), 129.2(d), 135.2(s), 157.8(s), 161.0(s), 169.1(s), 205.6(s)</p>
32		<p>(CDC13,500MHz) <math>\delta</math>ppm: 1.40(d,J=6.4Hz,3H), 1.63(m,2H), 1.79(ddd,J=14.9,6.4,3.0Hz,1H), 1.89(ddd,J=14.9,7.6,6.4Hz,1H), 2.20(m,2H), 3.04(dd,J=12.5,7.6Hz,1H), 3.16(dd,J=12.5,7.6Hz,1H), 3.78(ddd,J=6.7,6.4,5.2Hz,1H), 4.48(d,J=18.3Hz,1H), 4.59(d,J=18.3Hz,1H), 5.33(d-qui,J=6.4,3.0Hz,1H), 5.47(dt,J=15.2,7.6Hz,1H), 5.60(ddd,J=15.2,7.6,7.0Hz,1H), 6.53(s,1H)</p>	<p>(CDC13,125MHz) <math>\delta</math>ppm: 20.6(q), 28.0(t), 35.3(t), 42.1(t), 45.1(t), 46.4(t), 66.4(d), 71.7(d), 103.7(d), 108.5(s), 115.2(s), 123.5(d), 135.2(d), 135.8(s), 156.0(s), 161.2(s), 168.0(s), 205.0(s)</p>
33		<p>(CDC13,500MHz) <math>\delta</math>ppm: 1.42(d,J=6.4Hz,3H), 1.86(m,2H), 2.04(m,1H), 2.20(m,1H), 2.29(m,1H), 2.32(m,1H), 2.40(m,1H), 2.73(ddd,J=13.4,8.8,3.0Hz,1H), 3.60(ddd,J=6.7,6.4,5.8Hz,1H), 4.24(d,J=17.7Hz,1H), 4.38(d,J=17.7Hz,1H), 5.41-5.50(m,3H), 6.50(s,1H)</p>	<p>(CDC13,125MHz) <math>\delta</math>ppm: 20.3(q), 22.4(t), 34.6(t), 41.1(t), 41.4(t), 47.4(t), 69.3(d), 71.2(d), 103.8(d), 107.8(s), 115.1(s), 126.5(d), 131.1(d), 136.1(s), 156.7(s), 161.9(s), 168.8(s), 207.8(s)</p>
34		<p>(CDC13,500MHz) <math>\delta</math>ppm: 1.24(m,2H), 1.32(m,1H), 1.44(d,J=6.7Hz,3H), 1.46(m,2H), 1.60(m,2H), 1.69(m,1H), 1.84(ddd,J=15.3,6.7,3.0Hz,1H), 1.95(ddd,J=15.3,7.3,5.5Hz,1H), 2.32(ddd,J=15.9,9.2,3.7Hz,1H), 2.58(ddd,J=15.9,8.5,3.0Hz,1H), 3.71(ddd,J=6.7,6.1,5.5Hz,1H), 4.33(d,J=17.7Hz,1H), 4.51(d,J=17.7Hz,1H), 5.47(d-qui,6.7,2.4Hz,1H), 6.54(s,1H)</p>	<p>(CDC13,125MHz) <math>\delta</math>ppm: 20.3(q), 22.0(t), 22.8(t), 25.2(t), 34.9(t), 40.6(t), 42.3(t), 46.5(t), 66.4(d), 71.4(d), 103.8(d), 107.9(s), 115.3(s), 136.2(s), 156.3(s), 161.7(s), 168.3(s), 207.9(s)</p>

化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
35		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.52(d, J=6.7Hz, 3H), 1.57(m, 1H), 2.41(m, 1H), 3.01(ddd, J=2.3, 7.1, 8Hz, 1H), 3.34(m, 1H), 3.79(d, J=15.9Hz, 1H), 3.90(d, J=15.9Hz, 1H), 5.29(d-qui, J=6.7, 3.7Hz, 1H), 5.56(ddd, J=10.4, 3.0Hz, 1H), 6.16(m, 1H), 6.43(s, 1H), 6.83(d, J=15.9Hz, 1H), 7.22(ddd, J=15.9, 11.0Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 18.6(q), 36.2(t), 38.1(t), 56.6(d), 57.0(d), 72.3(d), 103.4(d), 114.6(s), 116.2(s), 121.9(d), 130.8(d), 132.5(d), 132.8(d), 135.5(s), 154.8(s), 156.7(s), 157.1(s), 169.0(s)
36		(CDCl3/CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.29(d, J=6.7Hz, 3H), 1.37(ddd, J=14.6, 9.2, 2.4Hz, 1H), 2.01(m, 1H), 2.16(m, 2H), 2.19(m, 1H), 2.50(ddd, J=14.0, 7.3, 0Hz, 1H), 2.79(ddd, J=14.0, 3.0Hz, 1H), 2.85(ddd, J=5.5, 3.0, 2.4Hz, 1H), 3.01(dt, J=9.2, 2.4Hz, 1H), 3.23(ddd, J=14.0, 10.4Hz, 1H), 3.93(m, 1H), 5.22(d-sxt, J=6.7, 2.4Hz, 1H), 5.35(dt, J=15.3, 7.3Hz, 1H), 5.52(dt, J=15.3, 7.9Hz, 1H), 6.26(s, 1H)	(CDCl3/CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 19.3(q), 33.1(t), 36.4(t), 37.1(t), 39.4(t), 54.6(d), 59.4(d), 70.1(d), 70.5(d), 102.0(d), 111.8(s), 113.7(s), 127.6(d), 129.8(d), 138.1(s), 155.8(s), 157.7(s), 169.4(s)
37		(CDCl3/CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.22(d, J=6.7Hz, 3H), 1.27(ddd, J=14.0, 6.7, 1.8Hz, 1H), 1.90(ddd, J=12.2, 11.6Hz, 1H), 2.07(ddd, J=14.0, 11.0, 3.0Hz, 1H), 2.40(m, 2H), 2.45(ddd, J=14.6, 3.0Hz, 1H), 2.66(ddd, J=14.0, 11.0Hz, 1H), 2.81(m, 1H), 2.88(q, J=2.4Hz, 1H), 4.05(m, 1H), 5.17(ddd, J=15.3, 9.8, 4.9Hz, 1H), 5.53(ddd, J=15.3, 10.4, 4.9Hz, 1H), 6.21(s, 1H)	(CDCl3/CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.1(q), 32.7(t), 37.0(t), 38.2(t), 38.8(t), 54.4(d), 59.4(d), 67.7(d), 69.9(d), 102.0(d), 112.7(s), 114.4(s), 127.5(d), 129.8(d), 136.1(s), 154.9(s), 155.1(s), 169.8(s)
38		(CDCl3/CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.44(d, J=6.1Hz, 3H), 1.84(dt, J=15.9, 4.9Hz, 1H), 1.96(m, 1H), 2.04(dt, J=15.9, 3.7Hz, 1H), 2.18(m, 1H), 2.41(ddd, J=14.0, 10.4, 3.7Hz, 1H), 2.55(ddd, J=14.0, 7.3, 2.4Hz, 1H), 2.74(dt, J=9.2, 2.4Hz, 1H), 2.96(m, 1H), 3.30(ddd, J=13.4, 9.8Hz, 1H), 3.39(ddd, J=13.4, 4.9Hz, 1H), 3.78(d-qui, J=6.1, 3.7Hz, 1H), 5.37(m, 1H), 5.52(ddd, J=10.4, 7.9Hz, 1H), 5.70(ddd, J=10.4, 5.4, 4.9Hz, 1H), 6.38(s, 1H)	(CDCl3/CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 18.6(q), 30.1(t), 36.4(t), 36.6(t), 38.8(t), 55.4(d), 56.8(d), 71.2(d), 72.1(d), 102.6(d), 107.4(s), 115.6(s), 124.2(d), 130.7(d), 138.8(s), 157.3(s), 161.7(s), 170.2(s)

化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
39		<p>(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) δppm: 1.08(d, J=6.1Hz, 3H), 1.52(dd, J=14.2, 6.7Hz, 1H), 1.57(ddd, J=14.2, 5.5, 4.9Hz, 1H), 2.18(t like, J=4.9Hz, 2H), 2.42(m, 2H), 2.66(m, 1H), 2.75(ddt, J=14.0, 5.5, 2.4Hz, 1H), 3.05(ddd, J=17.1, 9.2, 3.0Hz, 1H), 3.84(sxt, J=6.1Hz, 1H), 4.40(ddd, J=6.1, 5.5, 3.7Hz, 1H), 5.49(m, 2H), 6.28(s, 1H)</p>	<p>(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 125MHz) δppm: 22.7(q), 29.7(t), 34.6(t), 37.5(t), 40.5(t), 55.9(d), 57.4(d), 65.5(d), 77.7(d), 101.1(s), 102.0(d), 110.8(s), 126.4(d), 129.0(d), 137.9(s), 160.1(s), 162.0(s), 169.4(s)</p>
40		<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 0.98(t, J=7.3Hz, 3H), 1.21(m, 1H), 1.42(d, J=6.7Hz, 3H), 1.54(dt, J=15.3, 7.3Hz, 2H), 1.81(dt, J=15.3, 6.7Hz, 2H), 2.00(m, 2H), 2.05(m, 1H), 2.21(m, 1H), 2.34(ddd, J=15.9, 6.7, 3.0Hz, 1H), 2.50(dt, J=9.8, 1.8Hz, 1H), 2.85(m, 1H), 3.35(dd, J=12.8, 6.1Hz, 1H), 3.90(dd, J=12.8, 9.8Hz, 1H), 4.12(t, J=6.7Hz, 2H), 4.44(m, 1H), 5.15(d-qui, J=6.7, 2.4Hz, 1H), 5.35(dd, J=15.9, 4.3Hz, 1H), 5.53(ddd, J=15.9, 4.3, 1.8Hz, 1H), 6.55(s, 1H), 11.9(br.s, 1H)</p>	<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 14.0(q), 19.8(t), 20.3(q), 29.3(t), 31.1(t), 31.7(t), 36.5(t), 40.3(t), 57.2(d), 58.3(d), 69.7(t), 70.5(d), 70.6(d), 100.8(d), 107.8(s), 116.7(s), 127.8(d), 133.4(d), 140.4(s), 159.9(s), 164.5(s), 171.8(s)</p>
41		<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 0.92(t, J=7.3Hz, 3H), 0.97(t, J=7.3Hz, 3H), 1.07(m, 1H), 1.38(ddd, J=14.6, 9.2, 3.0Hz, 1H), 1.45(d, J=6.1Hz, 2H), 1.46(d, J=7.3Hz, 3H), 1.53(dt, J=15.3, 7.3Hz, 2H), 1.68(dt, J=14.6, 6.7Hz, 2H), 1.79(dt, J=15.3, 6.1Hz, 2H), 2.12-2.20(m, 3H), 2.33(ddd, J=14.6, 7.3, 3.7Hz, 1H), 2.71(m, 1H), 2.73(ddd, J=9.2, 6.1Hz, 1H), 2.83(m, 1H), 3.29(ddd, J=13.4, 7.3Hz, 1H), 4.04(t, J=6.1Hz, 2H), 4.12(t, J=6.1Hz, 2H), 4.48(qui, J=6.1Hz, 1H), 5.18(d-qui, J=7.3, 2.4Hz, 1H), 5.54(ddd, J=15.9, 6.1Hz, 1H), 5.59(ddd, J=15.9, 11.0Hz, 1H), 6.71(s, 1H)</p>	<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 14.0(q*2), 19.8(t*2), 19.9(q), 28.6(t), 31.9(t*2), 33.6(t), 39.1(t), 41.0(t), 56.1(d), 57.9(d), 69.3(t), 69.6(t), 71.5(d), 73.3(d), 98.1(d), 115.3(s), 120.1(s), 130.2(d), 136.0(d), 136.0(s), 156.2(s), 156.8(s), 167.4(s)</p>

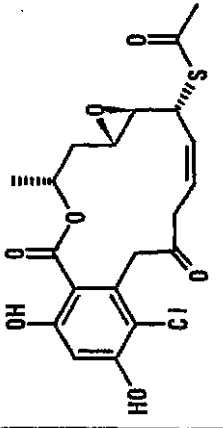
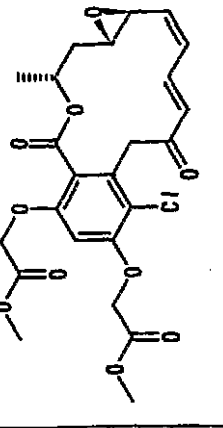
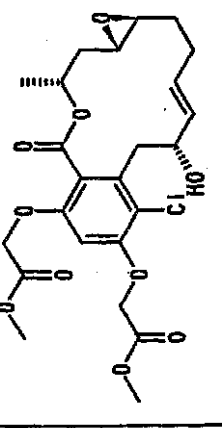
化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
42		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 0.90(t, J=7.3Hz, 3H), 1.22(m, 1H), 1.33-1.39(m, 4H), 1.42(d, J=6.7Hz, 3H), 1.52(m, 2H), 1.83(dt, J=15.3, 6.7Hz, 2H), 1.99(m, 2H), 2.05(m, 1H), 2.21(m, 1H), 2.33(ddd, J=16.5, 7.3, 3.7Hz, 1H), 2.50(dt, J=9.2, 1.8Hz, 1H), 2.83(m, 1H), 3.36(dd, J=12.2, 6.1Hz, 1H), 3.90(dd, J=12.2, 9.8Hz, 1H), 4.12(t, J=7.9Hz, 2H), 4.55(m, 1H), 5.15(d-qui, J=6.7, 1.8Hz, 1H), 5.35(dd, J=15.3, 3.7Hz, 1H), 5.53(ddd, J=15.3, 4.3, 1.8Hz, 1H), 6.55(s, 1H), 11.90(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 14.2(q), 20.3(q), 23.2(t), 26.3(t), 29.3(t), 29.5(t), 31.1(t), 32.2(t), 36.5(t), 40.3(t), 57.2(d), 58.3(d), 70.0(t), 70.5(d), 70.6(d), 100.9(d), 107.8(s), 116.7(s), 127.8(d), 133.4(d), 140.4(s), 159.9(s), 164.5(s), 171.8(s)
43		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 0.88(t, J=7.3Hz, 3H), 0.90(t, J=7.3Hz, 3H), 1.07(m, 1H), 1.31(m, 4H), 1.35(m, 4H), 1.38(m, 1H), 1.43(m, 2H), 1.46(d, J=6.1Hz, 3H), 1.51(m, 2H), 1.69(dt, J=14.8, 6.7Hz, 2H), 1.81(dt, J=15.2, 6.1Hz, 2H), 2.11-2.21(m, 3H), 2.34(ddd, J=14.6, 7.3, 3.7Hz, 1H), 2.71(dd, J=7.3, 1.8Hz, 1H), 2.73(dd, J=13.4, 5.5Hz, 1H), 2.83(m, 1H), 3.29(dd, J=13.4, 7.3Hz, 1H), 4.03(t, J=6.1Hz, 2H), 4.11(t, J=6.1Hz, 2H), 4.49(dd, J=12.5, 5.5Hz, 1H), 5.18(d-qui, J=6.1, 2.4Hz, 1H), 5.54(dd, J=15.9, 6.1Hz, 1H), 5.59(dd, J=15.9, 4.9Hz, 1H), 6.71(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 14.2(q x 2), 19.9(q), 23.2(t x 2), 26.3(t), 26.4(t), 28.6(t), 29.8(t), 29.9(t), 32.2(t x 2), 33.6(t), 39.1(t), 41.0(t), 56.1(d), 57.9(d), 69.6(t), 69.9(t), 71.5(d), 73.3(d), 98.1(d), 115.3(s), 120.1(s), 130.2(d), 136.0(d), 136.0(s), 156.2(s), 156.8(s), 167.4(s)
44		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 0.97(t, J=7.3Hz, 3H), 1.05(t, J=7.3Hz, 3H), 1.08(m, 1H), 1.38(ddd, J=14.0, 8.5, 2.4Hz, 1H), 1.46(d, J=6.1Hz, 3H), 1.71(dt, J=13.4, 7.3Hz, 2H), 1.82(dt, J=13.4, 7.3Hz, 2H), 2.11-2.20(m, 3H), 2.33(ddd, J=14.6, 7.3, 3.6Hz, 1H), 2.71(dt, J=7.9, 2.4Hz, 1H), 2.73(dd, J=13.4, 5.5Hz, 1H), 2.82(ddd, J=8.5, 3.6, 2.4Hz, 1H), 3.30(dd, J=13.4, 7.3Hz, 1H), 3.99(t, J=6.1Hz, 2H), 4.07(t, J=6.1Hz, 2H), 4.49(qui, J=6.1Hz, 1H), 5.18(d-qui, J=6.1, 2.4Hz, 1H), 5.54(dd, J=15.9, 6.1Hz, 1H), 5.59(dd, J=15.9, 5.5Hz, 1H), 6.70(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 10.8(q x 2), 19.9(q), 23.2(t x 2), 28.6(t), 33.6(t), 39.1(t), 41.0(t), 56.1(d), 57.9(d), 71.1(t), 71.3(t), 71.5(d), 73.3(d), 98.1(d), 115.4(s), 120.1(s), 130.2(d), 136.0(d), 136.0(s), 156.2(s), 156.7(s), 167.4(s)

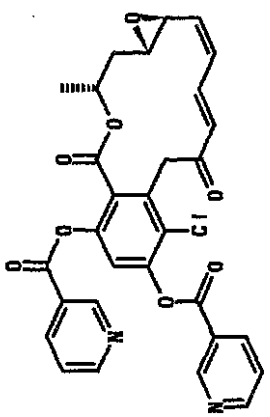
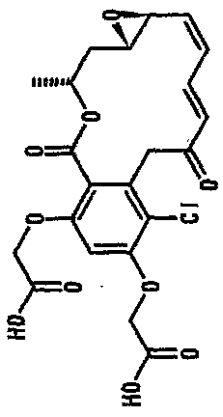
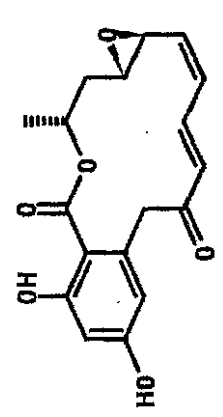
化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
45		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.06(m, 1H), 1.07-1.34(m, 10H), 1.39(ddd, J=14.6, 8.6, 2.4Hz, 1H), 1.47(d, J=6.1Hz, 3H), 1.63-1.85(m, 10H), 1.90(m, 2H), 2.11-2.21(m, 3H), 2.34(ddd, J=14.6, 7.9, 4.3Hz, 1H), 2.70(m, 1H), 2.73(dd, J=13.4, 5.5Hz, 1H), 2.83(ddd, J=8.6, 3.7, 1.8Hz, 1H), 3.30(dd, J=13.4, 7.3Hz, 1H), 3.84(d, J=6.1Hz, 2H), 3.91(d, J=6.7Hz, 2H), 4.49(ddd, J=12.5, 5.5Hz, 1H), 5.19(d-qui, J=6.1, 2.4Hz, 1H), 5.53(dd, J=15.9, 6.7Hz, 1H), 5.55(dd, J=15.9, 5.5Hz, 1H), 6.70(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.0(q), 26.5(t x 2), 27.2(t x 2), 28.5(t), 30.2(t x 2), 30.3(t x 2), 30.4(t x 2), 33.6(t), 38.6(d), 38.7(d), 39.1(t), 41.0(t), 56.2(d), 57.9(d), 71.6(d), 73.3(d), 74.8(t), 75.1(t), 97.9(d), 115.3(s), 119.9(s), 130.1(d), 136.0(d), 136.0(s), 156.3(s), 156.9(s), 167.5(s)
46		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.38(d, J=6.7Hz, 3H), 1.92(ddd, J=14.6, 9.2, 3.7Hz, 1H), 2.05(m, 1H), 2.08(m, 1H), 2.18(ddd, J=14.6, 9.3, 3.0Hz, 1H), 2.28(m, 1H), 2.38(m, 1H), 3.30(m, 1H), 3.45(ddd, J=12.2, 9.2Hz, 1H), 4.10(ddd, J=9.2, 3.7Hz, 1H), 4.25(ddd, J=9.2, 3.7Hz, 1H), 4.37(m, 1H), 5.30(m, 1H), 5.31(m, 1H), 5.61(ddd, J=15.9, 9.2, 6.7Hz, 1H), 6.43(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.7(q), 32.9(t), 32.2(t), 40.0(t), 42.9(t), 61.4(d), 67.8(d), 71.4(d), 71.6(d), 103.5(d), 111.5(s), 115.6(s), 129.6(d), 133.6(d), 138.3(s), 158.5(s), 160.8(s), 171.0(s)
47		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.08(m, 1H), 1.40(d, J=6.4Hz, 3H), 1.49(m, 2H), 1.52(m, 1H), 1.62(m, 1H), 1.87(ddd, J=15.5, 5.2, 4Hz, 1H), 1.96(m, 1H), 2.14(ddd, J=15.5, 6.4, 4.0Hz, 1H), 2.49(m, 2H), 2.59(dt, J=9.1, 2.4Hz, 1H), 2.78(ddd, J=5.4, 0.2, 4Hz, 1H), 3.70(d, J=17.4Hz, 1H), 4.32(d, J=17.4Hz, 1H), 5.21(d-qui, J=6.4, 2.4Hz, 1H), 6.24(d, J=2.4Hz, 1H), 6.28(d, J=2.4Hz, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 19.4(q), 22.8(t), 24.2(t), 31.8(t), 37.0(t), 40.8(t), 50.5(t), 55.4(d), 57.7(d), 71.2(d), 102.8(d), 106.4(s), 113.6(d), 140.7(s), 163.2(s), 166.1(s), 171.5(s), 207.7(s)
48		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.31(m, 1H), 1.33(d, J=6.7Hz, 3H), 1.32-1.36(m, 7H), 1.43(m, 1H), 1.53(ddd, J=9.2, 7.3, 2.4Hz, 1H), 1.80(m, 1H), 1.85(m, 1H), 2.54(ddd, J=18.3, 5.3, 7Hz, 1H), 2.77(ddd, J=18.3, 11.0, 3.7Hz, 1H), 3.79(d, J=17.7Hz, 1H), 4.61(d, J=17.7Hz, 1H), 5.15(dq, J=6.7, 3.7Hz, 1H), 6.19(d, J=2.4Hz, 1H), 6.30(d, J=2.4Hz, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 21.2(q), 22.4(t), 23.3(t), 23.8(t), 24.6(t), 27.4(t), 35.2(t), 39.4(t), 50.5(t), 74.4(d), 102.6(d), 106.3(s), 113.8(d), 140.9(s), 163.0(s), 166.4(s), 172.2(s), 207.0(s)

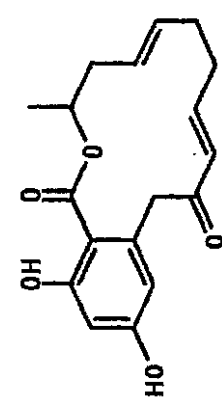
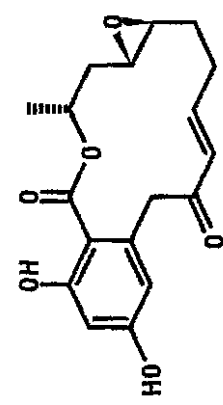
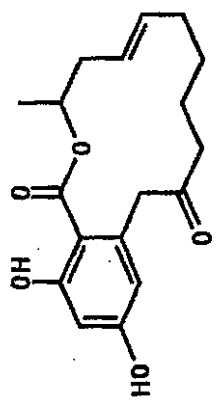
化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
49		<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 1.37(d, J=6.1Hz, 3H), 2.02(m, 2H), 2.12(m, 2H), 2.29(ddd, J=14.0, 7.3, 6.1Hz, 1H), 2.56(ddd, J=14.0, 6.1, 3.7Hz, 1H), 3.23(dd, J=15.3, 5.5Hz, 1H), 3.25(dd, J=15.3, 5.5Hz, 1H), 4.25(q, J=6.1Hz, 1H), 5.23(d-qui, J=6.1, 3.7Hz, 1H), 5.27(dd, J=15.9, 6.1Hz, 1H), 5.28(dd, J=15.9, 8.5Hz, 1H), 5.39(dd, J=15.9, 6.1Hz, 1H), 5.43(dd, J=15.9, 6.7Hz, 1H), 6.24(d, J=2.4Hz, 1H), 6.53(d, J=2.4Hz, 1H)</p>	<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 19.5(q), 31.1(t), 32.2(t), 38.3(t), 42.4(t), 72.8(d), 73.4(d), 102.0(d), 107.4(s), 112.6(d), 127.0(d), 130.6(d), 133.3(d), 134.5(d), 144.4(s), 162.2(s), 164.6(s), 171.2(s)</p>
50		<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 1.39(d, J=6.7Hz, 3H), 1.94(m, 1H), 2.09(m, 1H), 2.12(m, 2H), 2.29(dt, J=15.3, 6.7Hz, 1H), 2.67(ddd, J=15.3, 7.3, 3.7Hz, 1H), 2.85(dd, J=13.4, 6.1Hz, 1H), 3.72(dd, J=13.4, 7.3Hz, 1H), 4.17(dd, J=11.0, 7.3Hz, 1H), 5.20(ddd, J=15.3, 6.1, 3.7Hz, 1H), 5.22(q, J=6.7Hz, 1H), 5.33(dd, J=15.3, 4.3Hz, 1H), 5.35(ddd, J=15.3, 11.0, 5.5Hz, 1H), 5.43(ddd, J=15.3, 9.2, 7.3Hz, 1H), 6.23(d, J=2.4Hz, 1H), 6.50(d, J=2.4Hz, 1H), 9.05(br.s, 1H), 11.87(br.s, 1H)</p>	<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 19.5(q), 31.0(t), 31.9(t), 37.8(t), 43.4(t), 73.3(d), 75.0(d), 102.0(d), 105.9(s), 112.1(d), 126.4(d), 128.3(d), 133.8(d), 135.0(d), 145.5(s), 162.8(s), 166.2(s), 172.4(s)</p>
51		<p>(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.23(ddd, J=14.0, 9.2, 3.7Hz, 1H), 1.40(d, J=6.1Hz, 3H), 2.05(m, 1H), 2.11(m, 2H), 2.13(m, 1H), 2.25(m, 1H), 2.57(dt, J=9.2, 2.4Hz, 1H), 2.74(dd, J=12.2, 6.7Hz, 1H), 2.91(dd, J=6.1, 2.4Hz, 1H), 3.77(dd, J=12.2, 7.9Hz, 1H), 4.13(dd, J=12.8, 6.7Hz, 1H), 5.16(d-qui, 6.1, 1.8Hz, 1H), 5.43(dd, J=15.9, 4.9Hz, 1H), 5.54(ddd, J=15.9, 4.9, 1.2Hz, 1H), 6.20(d, J=2.4Hz, 1H), 6.30(d, J=2.4Hz, 1H)</p>	<p>(CD3OD, 125MHz) δppm: 19.9(q), 29.4(t), 31.8(t), 36.9(t), 43.2(t), 58.2(d), 58.9(d), 70.5(d), 74.9(d), 102.5(d), 106.2(s), 113.3(d), 129.7(d), 133.3(d), 144.6(s), 163.5(s), 166.4(s), 172.6(s)</p>

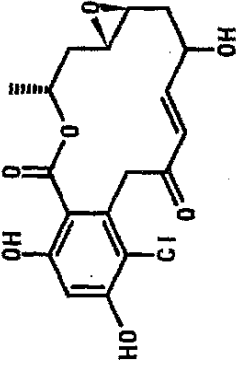
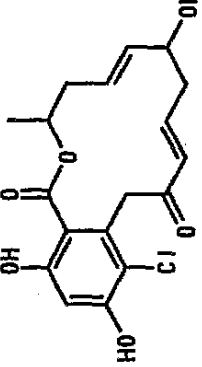
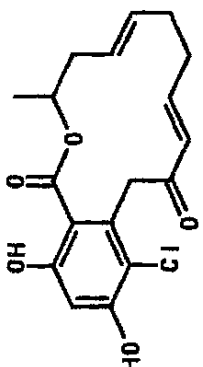
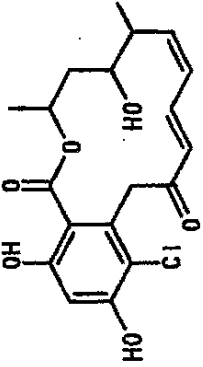


化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
52		<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz) (約1:1の回転異性体) δppm: 1.39(d, J=6.7Hz, 1.5H), 1.41(d, J=6.7Hz, 1.5H), 1.50-1.57(m, 1.0H), 2.28(dt, J=14.6, 3.7Hz, 0.5H), 2.37(dt, J=14.0, 3.7Hz, 0.5H), 3.01(dt, J=7.9, 3.0Hz, 0.5H), 3.13(dt, J=8.6, 2.4Hz, 0.5H), 3.35(m, 0.5H), 3.38(m, 0.5H), 3.63(d, J=15.9Hz, 0.5H), 3.76(d, J=16.5Hz, 0.5H), 3.78(s, 4H), 3.85(d, J=15.9Hz, 0.5H), 3.97(d, J=16.5Hz, 0.5H), 5.17(m, 0.5H), 5.20(m, 0.5H), 5.70(dd, J=11.0, 4.9Hz, 0.5H), 5.74(dd, J=11.0, 3.7Hz, 0.5H), 6.04(d, J=15.9Hz, 0.5H), 6.09(d, J=16.5Hz, 0.5H), 6.22(t, J=11.6Hz, 0.5H), 6.25(t, J=10.4Hz, 0.5H), 6.54(s, 0.5H), 6.70(s, 0.5H), 7.18(m, 2H), 7.28-7.38(m, 7H), 7.42(d, J=7.9Hz, 2H)</p>	<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 125MHz) (約1:1の回転異性体) δppm: 18.1(q), 18.2(q), 34.7(t), 34.9(t), 36.3(t), 36.4(t), 44.6(t), 44.9(t), 54.2(d × 2), 55.0(d), 55.1(d), 69.6(d), 70.8(d), 109.4(d), 110.1(d), 119.4(s × 2), 119.5(s × 2), 125.8(d), 126.5(d), 127.7(d × 2), 128.4(d × 2), 129.0(d × 2), 129.1(d × 2), 129.6(d), 129.7(d), 130.5(d × 2), 133.1(d), 134.5(s), 136.1(d), 136.2(d), 138.2(d), 138.4(d), 146.6(s), 146.7(s), 154.9(s), 155.3(s), 163.8(s × 2), 166.1(s), 167.8(s), 170.5(s × 2), 195.4(s), 195.8(s)</p>
53		<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 1.22(d, J=6.7Hz, 3H), 1.31(ddd, J=14.0, 8.5, 2.4Hz, 1H), 2.24(ddd, J=14.0, 9.8, 3.7Hz, 1H), 2.94(ddd, J=8.5, 4.3, 2.4Hz, 1H), 2.99(d, J=7.9Hz, 2H), 3.05(dd, J=8.5, 2.4Hz, 1H), 3.61(t, J=8.5Hz, 1H), 3.84(d, J=1.8Hz, 2H), 5.08(dq, J=6.7, 2.4Hz, 1H), 5.55(dd, J=15.3, 8.5Hz, 1H), 5.84(dt, J=15.3, 7.9Hz, 1H), 6.48(s, 1H), 7.25(t, J=7.3Hz, 1H), 7.31(t, J=7.3Hz, 2H), 7.40(t, J=7.3Hz, 2H), 9.91(s, 1H), 10.39(s, 1H)</p>	<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 20.0(q), 37.3(t), 43.5(t), 45.1(t), 52.2(d), 54.6(d), 59.3(d), 70.3(d), 102.2(d), 112.0(s), 115.0(s), 126.9(d), 127.2(d), 128.9(d, × 2), 130.6(d), 131.2(d, × 2), 132.0(s), 133.5(s), 154.0(s), 154.6(s), 166.9(s), 203.1(s)</p>
54		<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 1.22(d, J=6.1Hz, 3H), 1.30(ddd, J=14.6, 8.5, 2.3Hz, 1H), 2.23(ddd, J=14.6, 10.4, 3.7Hz, 1H), 2.35(s, 3H), 3.00(m, 2H), 3.07(dd, J=15.3, 7.3Hz, 1H), 3.11(dd, J=7.9, 1.8Hz, 1H), 3.76(t, J=7.9Hz, 1H), 3.87(s, 2H), 5.10(dq, J=6.1, 3.7Hz, 1H), 5.63(dd, J=15.3, 7.9Hz, 1H), 5.91(ddd, J=15.3, 7.9, 7.3Hz, 1H), 6.48(s, 1H), 9.91(s, 1H), 10.37(s, 1H)</p>	<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 20.1(q), 30.6(q), 37.3(t), 43.4(t), 45.2(t), 48.1(d), 55.3(d), 58.0(d), 70.2(d), 102.2(d), 112.1(s), 115.0(s), 127.2(d), 130.0(d), 132.0(s), 153.9(s), 154.6(s), 166.9(s), 193.6(s), 203.0(s)</p>

化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
55		(DMSO-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.22(d, J=5.5Hz, 3H), 1.30(m, 1H), 2.08(m, 1H), 2.38(s, 3H), 2.58(m, 1H), 3.06(br, s, 1H), 3.20(dd, J=18.3, 4.9Hz, 1H), 3.71(dd, J=18.3, 11.0Hz, 1H), 3.98(br, d, J=3.7Hz, 2H), 4.80(d, J=10.4Hz, 1H), 5.13(q like, J=5.5Hz, 1H), 5.17(dd, J=11.0, 10.4Hz, 1H), 5.67(dt, J=11.0, 4.9Hz, 1H), 6.49(s, 1H), 9.87(s, 1H), 10.39(s, 1H)	(DMSO-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.3(q), 30.6(q), 37.8(t), 40.4(t), 40.8(d), 44.2(t), 52.9(d), 58.8(d), 70.2(d), 102.3(d), 112.0(s), 114.6(s), 126.1(d), 126.7(d), 132.5(s), 154.4(s), 154.7(s), 167.2(s), 193.9(s), 203.8(s)
56		(DMSO-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.10(d, J=6.7Hz, 3H), 1.15-1.24(m, 1H), 2.04(dt, J=14.0, 3.1Hz, 1H), 2.79(dt, J=6.1, 2.4Hz, 1H), 2.97(s, 1H), 3.10-3.20(m, 1H), 3.33(s, 3H), 3.35(s, 3H), 3.56(d, J=15.9Hz, 1H), 4.55(d, J=11.6Hz, 1H), 4.63(d, J=11.6Hz, 1H), 4.60-4.68 (m, 2H), 4.86-4.92(m, 1H), 5.38(dd, J=10.4, 4.9Hz, 1H), 5.75(d, J=15.9Hz, 1H), 5.89(t, J=10.4Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 7.00-7.06(m, 1H)	(DMSO-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 18.1(q), 36.4(t), 44.7(t), 51.8(q), 51.9(q), 54.8(d), 54.9(d), 65.3(t), 65.4(t), 70.4(d), 98.6(d), 114.6(s), 118.6(s), 129.7(d), 130.4(d), 131.7(s), 136.4(d), 138.3(d), 154.2(s), 154.6(s), 165.0(s), 168.3(s), 168.4(s), 195.0(s)
57		(DMSO-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 0.66-0.73(m, 1H), 1.02(ddd, J=14.7, 9.2, 2.4Hz, 1H), 1.11(d, J=6.1Hz, 3H), 1.76-1.84(m, 3H), 1.98(ddd, J=1.7, 7.3, 4.3Hz, 1H), 2.28(dd, J=13.4, 6.1Hz, 1H), 2.41(d like, J=9.2Hz, 1H), 2.50(ddd, J=8.5, 3.7, 2.4Hz, 1H), 2.86(dd, J=13.4, 7.3Hz, 1H), 3.38(s, 3H), 3.42(s, 3H), 3.94-3.98(m, 1H), 4.52(s, 2H), 4.68(s, 2H), 4.78(ddd, J=13.4, 6.7, 2.4Hz, 1H), 5.08-5.18(m, 2H), 6.36(s, 1H)	(DMSO-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 19.1(q), 27.5(t), 32.1(t), 37.6(t), 39.0(t), 51.8(q), 51.9(q), 55.0(d), 56.8(d), 65.4(t), 65.5(t), 70.9(d), 71.5(d), 97.8(d), 114.5(s), 119.3(s), 128.9(d), 134.9(s), 135.2(d), 153.4(s), 154.2(s), 165.9(s), 168.4(s), 168.5(s)

化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
58		<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 0.86-0.95(m, 1H), 0.93(d, J=6.1Hz, 3H), 1.84(dt, J=14.7, 3.7Hz, 1H), 2.73(dt, J=7.9, 3.1Hz, 1H), 2.97(s, 1H), 3.60(d, J=15.9Hz, 1H), 3.87(d, J=15.9Hz, 1H), 4.76-4.83(m, 1H), 5.44(dd, J=10.4, 4.3Hz, 1H), 5.78(d, J=15.9Hz, 1H), 5.94(t, J=10.4Hz, 1H), 7.00(dd, J=15.9, 10.4Hz, 1H), 7.35(dt, J=7.9, 4.9Hz, 2H), 7.54(s, 1H), 8.10(dt, J=7.9, 1.8Hz, 1H), 8.17(dt, J=7.9, 1.8Hz, 1H), 8.60(dt, J=4.3, 1.2Hz, 2H), 8.88(d, J=2.4Hz, 1H), 8.94(d, J=2.4Hz, 1H)</p>	<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 18.1(q), 36.2(t), 44.5(t), 54.3(d), 54.8(d), 71.7(d), 119.0(d), 123.8(s), 124.0(s), 124.3(d), 124.4(d), 126.0(s), 127.3(s), 129.6(d), 130.4(d), 133.6(s), 136.5(d), 137.6(d), 137.8(d), 138.5(d), 146.5(s), 148.1(s), 150.5(d), 150.7(d), 154.8(d), 154.9(d), 162.2(s), 163.0(s), 163.2(s), 194.7(s)</p>
59		<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 0.93(d, J=6.7Hz, 3H), 1.42-1.50(m, 1H), 2.23-2.40(m, 1H), 2.79-2.84(m, 1H), 2.94(s, 1H), 3.26-3.33(m, 2H), 4.32(s, 2H), 4.48(s, 2H), 4.86-4.94(m, 1H), 5.34-5.46(m, 1H), 5.65(d, J=16.5Hz, 1H), 6.06(t, J=10.4Hz, 1H), 6.37(s, 1H), 6.70(dd, J=16.5, 11.0Hz, 1H), 12.60(brs, 2H)</p>	<p>(DMSO-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 19.7(q), 36.0(t), 44.1(t), 59.6(d), 59.7(d), 65.7(t), 65.9(t), 70.8(d), 99.8(d), 115.1(s), 118.6(s), 130.1(d), 130.8(s), 131.7(d), 132.0(d), 132.8(d), 154.1(s), 166.2(s), 169.0(s), 169.1(s), 169.3(s), 199.0(s)</p>
60		<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 500MHz) δppm: 1.60(d, J=6.7Hz, 3H), 1.85(ddd, J=14.9, 8.5, 3.7Hz, 1H), 2.44(dt, J=14.9, 3.7Hz, 1H), 3.12(dt, J=8.5, 2.7Hz, 1H), 3.32(qui, J=2.7Hz, 1H), 3.56(d, J=14.0Hz, 1H), 4.97(d, J=14.0Hz, 1H), 5.83(dd, J=10.7, 2.7Hz, 1H), 5.97(d, J=16.1Hz, 1H), 6.28(d, J=2.7Hz, 1H), 6.29(d, J=2.7Hz, 1H), 6.30(ddd, J=11.3, 10.7, 1.5Hz, 1H), 7.83(ddd, J=16.1, 11.3, 1.5Hz, 1H), 9.16(brs, 1H), 10.94(brs, 1H)</p>	<p>(Acetone-d<sub>6</sub>, 125MHz) δppm: 18.9(q), 36.9(t), 43.9(t), 55.7(d), 56.0(d), 72.0(d), 102.8(d), 106.0(s), 110.1(d), 130.6(d), 131.7(d), 137.2(d), 140.3(s), 141.6(d), 162.9(s), 165.5(s), 170.4(s), 198.9(s)</p>

化合物番号	構造	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
61		(Acetone-d <sub>6</sub> , 500MHz) δppm: 1.23(d, J=6.4Hz, 3H), 2.04(m, 1H), 2.12(m, 1H), 2.12-2.25(m, 3H), 2.39(dt, J=10.4, 3.0Hz, 1H), 3.50(d, J=15.2Hz, 1H), 3.90(d, J=15.2Hz, 1H), 5.09(d-sxt, J=6.4, 3.0Hz, 1H), 5.29(ddd, J=15.2, 7.0, 4.3Hz, 1H), 5.31(ddd, J=15.2, 7.6, 4.9Hz, 1H), 5.86(d, J=16.1Hz, 1H), 6.09(d, J=2.4Hz, 1H), 6.20(d, J=2.4Hz, 1H), 6.64(ddd, J=16.1, 7.6, 6.4Hz, 1H), 9.92(br.s, 1H), 10.27(br.s, 1H)	(Acetone-d <sub>6</sub> , 125MHz) δppm: 19.2(q), 30.3(t), 30.4(t), 37.9(t), 45.2(t), 71.0(d), 101.4(d), 108.8(d), 110.3(s), 128.3(d), 129.7(d), 131.2(d), 136.6(s), 148.2(d), 159.5(s), 160.2(s), 168.4(s), 196.6(s)
62		(Acetone-d <sub>6</sub> , 500MHz) δppm: 1.19(m, 1H), 1.37(d, J=6.7Hz, 3H), 1.63(ddd, J=16.1, 5.2, 4.0Hz, 1H), 2.06(dt, J=16.1, 4.0Hz, 1H), 2.27(m, 1H), 2.29(m, 1H), 2.47(dd, J=8.8, 4.6Hz, 1H), 2.51(dt, J=9.4, 2.7Hz, 1H), 2.80(ddd, J=5.5, 4.0, 2.7Hz, 1H), 3.65(d, J=17.7Hz, 1H), 4.65(d, J=17.7Hz, 1H), 5.18(m, 1H), 6.02(d, J=15.8Hz, 1H), 6.24(d, J=2.4Hz, 1H), 6.27(d, J=2.4Hz, 1H), 6.91(ddd, J=15.8, 11.0, 4.6Hz, 1H), 9.23(br.s, 1H), 11.91(br.s, 1H)	(Acetone-d <sub>6</sub> , 125MHz) δppm: 18.1(q), 29.8(t), 31.8(t), 37.0(t), 48.2(t), 55.7(d), 57.0(d), 72.5(d), 102.8(d), 105.9(s), 113.9(d), 131.9(d), 141.3(s), 148.6(d), 163.4(s), 167.1(s), 171.9(s), 196.9(s)
63		(Acetone-d <sub>6</sub> , 500MHz) δppm: 1.36(d, J=6.7Hz, 3H), 1.50(m, 2H), 1.59(m, 2H), 2.03(m, 1H), 2.10(m, 1H), 2.30(dt, J=14.0, 5.5Hz, 1H), 2.49(m, 2H), 2.56(ddd, J=14.0, 3.7, 3.0Hz, 1H), 3.56(d, J=17.1Hz, 1H), 4.36(d, J=17.1Hz, 1H), 5.28(d-qui, J=6.7, 3.7Hz, 1H), 5.45(ddd, J=15.9, 5.5Hz, 1H), 5.48(dd, J=15.9, 5.5Hz, 1H), 6.24(d, J=2.4Hz, 1H), 6.31(d, J=2.4Hz, 1H), 9.19(br.s, 1H), 11.76(br.s, 1H)	(Acetone-d <sub>6</sub> , 125MHz) δppm: 19.1(q), 22.9(t), 26.0(t), 33.0(t), 38.1(t), 41.1(t), 50.4(t), 73.5(d), 102.7(d), 106.2(s), 113.2(d), 125.8(d), 135.2(d), 140.9(s), 163.1(s), 166.4(s), 171.8(s), 207.3(s)

化合物番号	構造	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR
64		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.26(dd, J=12.2, 9.2Hz, 1H), 1.44(d, J=6.1Hz, 3H), 1.76(d, J=15.9Hz, 1H), 2.54(d, J=12.2Hz, 1H), 2.61(d, J=9.2Hz, 1H), 2.87(br.s, 1H), 4.36(d, J=18.3Hz, 1H), 4.36(m, 1H), 4.53(d, J=18.3Hz, 1H), 5.21(br.s, 1H), 6.14(d, J=15.9Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 6.82(dd, J=15.9, 9.2Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 18.0(q), 37.4(t), 41.2(t), 45.7(t), 55.4(d), 56.8(d), 70.5(d), 73.4(d), 104.3(d), 107.8(s), 116.8(s), 129.4(d), 137.2(s), 150.6(d), 160.0(s), 164.2(s), 171.3(s), 198.5(s)
65		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.19(q, J=6.4Hz, 3H), 2.16(ddd, J=14.3, 7.6, 6.7Hz, 1H), 2.25(dt, J=12.8, 8.2Hz, 1H), 2.36(ddd, J=12.8, 7.3, 3.4Hz, 1H), 2.47(ddd, J=14.3, 6.7, 3.7Hz, 1H), 4.10(d, J=17.7Hz, 1H), 4.14(d, J=17.7Hz, 1H), 4.24(m, 1H), 5.20(m, 1H), 5.23(dd, J=15.5, 6.1Hz, 1H), 5.38(dt, J=15.5, 7.6Hz, 1H), 5.80(d, J=15.8Hz, 1H), 6.35(s, 1H), 6.69(dt, J=15.8, 8.2Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 18.9(q), 38.0(t), 40.8(t), 45.8(t), 72.6(d), 73.5(d), 104.1(d), 109.6(s), 116.7(s), 126.3(d), 132.1(d), 136.6(s), 137.1(d), 146.1(d), 159.9(s), 162.3(s), 170.7(s), 198.7(s)
66		(Acetone-d6, 500MHz) δppm: 1.28(d, J=6.4Hz, 3H), 2.15(m, 2H), 2.24(m, 1H), 2.28(m, 2H), 2.57(ddd, J=14.6, 8.2, 4.3Hz, 1H), 4.10(d, J=17.7Hz, 1H), 4.33(d, J=17.7Hz, 1H), 5.23(dd like, J=15.2, 7.3Hz, 1H), 5.36(ddd, J=15.2, 8.8, 5.8Hz, 1H), 5.37(dq, J=6.4, 3.7Hz, 1H), 5.81(d, J=15.5Hz, 1H), 6.57(s, 1H), 6.65(dt, J=15.5, 7.3Hz, 1H), 9.85(br.s, 1H), 11.46(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) δppm: 18.1(q), 31.8(t x 2), 37.3(t), 46.2(t), 73.4(d), 103.8(d), 108.4(s), 116.1(s), 127.7(d), 131.0(d), 133.0(d), 138.0(s), 147.3(d), 158.8(s), 163.5(s), 170.7(s), 195.2(s)
67		(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.42(d, J=6.4Hz, 3H), 1.85(m, 2H), 3.12(s, 3H), 3.70(d, J=16.4Hz, 1H), 3.86(m, 1H), 4.20(d, J=16.4Hz, 1H), 4.41(ddd, J=7.9, 4.6Hz, 1H), 5.36(sxt, J=6.4Hz, 1H), 5.70(ddd, J=10.0, 9.7Hz, 1H), 5.90(d, J=16.4Hz, 1H), 6.29(ddd, J=11.3, 10.0Hz, 1H), 6.43(s, 1H), 7.29(ddd, J=16.4, 11.3Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 19.4(q), 37.9(t), 45.8(t), 57.4(q), 70.1(d), 71.0(d), 82.0(d), 103.6(d), 114.4(s), 116.2(s), 131.7(d), 132.5(d), 135.1(s), 140.8(d), 142.5(d), 157.0(s), 157.2(s), 168.1(s), 200.2(s)

化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
68		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.28(d, J=6.7Hz, 3H), 2.24(ddd, J=12.8, 7.3, 4.3Hz, 1H), 2.34(dt, J=14.0, 8.5Hz, 1H), 2.48(ddd, J=14.0, 7.3, 4.9Hz, 1H), 2.65(ddd, J=14.0, 7.3, 4.3Hz, 1H), 3.98(d, J=16.5Hz, 1H), 4.04(d, J=16.5Hz, 1H), 4.41(qui, J=4.9Hz, 1H), 5.37(m, 1H), 5.38(m, 1H), 5.52(dt, J=15.3, 7.9Hz, 1H), 5.89(d, J=15.9Hz, 1H), 6.29(d, J=2.4Hz, 1H), 6.31(d, J=2.4Hz, 1H), 6.73(ddd, J=15.9, 8.5, 7.3Hz, 1H).	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 18.7(q), 97.2(t), 40.7(t), 48.3(t), 72.1(d), 72.8(d), 102.8(d), 106.6(s), 113.2(d), 125.2(d), 132.5(d), 137.6(d), 141.2(s), 144.9(d), 163.0(s), 165.8(s), 171.0(s), 196.8(s)
69		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.37(d, J=6.7Hz, 3H), 1.65(m, 1H), 1.75(m, 1H), 1.91(m, 1H), 2.00(ddd, J=15.3, 7.9Hz, 1H), 2.10(ddd, J=15.3, 7.9, 3.0Hz, 1H), 2.18(m, 1H), 2.30(ddd, J=19.5, 6.7, 3.0Hz, 1H), 2.58(ddd, J=19.5, 10.4, 3.0Hz, 1H), 4.12(d, J=18.3Hz, 1H), 4.23(dt, J=7.9, 3.0Hz, 1H), 4.42(d, J=18.3Hz, 1H), 5.24(ddd, J=15.3, 7.9Hz, 1H), 5.45(qui, J=6.7Hz, 1H), 5.50(ddd, J=15.3, 10.4, 4.3Hz, 1H), 6.45(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.5(q), 21.0(t), 32.4(t), 40.2(t), 43.1(t), 47.3(t), 71.2(d), 71.8(d), 104.0(d), 109.0(s), 116.6(s), 133.0(d), 134.4(d), 137.2(s), 159.8(s), 163.4(s), 171.5(s), 208.5(s)
70		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.38(d, J=6.7Hz, 3H), 1.46(m, 1H), 1.59(m, 2H), 1.65(m, 1H), 2.02(m, 1H), 2.10(m, 1H), 2.34(dt, J=14.6, 6.1Hz, 1H), 2.52(m, 1H), 2.56(m, 2H), 4.09(d, J=17.7Hz, 1H), 4.48(d, J=17.7Hz, 1H), 5.34(d-qui, J=6.7, 3.0Hz, 1H), 5.49(d, J=15.3, 5.5Hz, 1H), 5.50(ddd, J=15.3, 5.5Hz, 1H), 6.54(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 19.1(q), 23.0(t), 26.3(t), 32.8(t), 38.3(t), 41.4(t), 46.9(t), 73.8(d), 103.7(d), 108.4(s), 115.9(s), 125.8(d), 135.4(d), 137.9(s), 158.8(s), 163.3(s), 171.0(s), 206.0(s)
71		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.34(d, J=6.1Hz, 3H), 1.56(dt, J=13.4, 1.8Hz, 1H), 2.15(dt, J=12.1, 4.3Hz, 1H), 2.96(ddd, J=14.0, 5.5Hz, 1H), 3.27(ddd, J=14.0, 6.1Hz, 1H), 3.81(d, J=18.3Hz, 1H), 4.65(dt, J=11.0, 4.3Hz, 1H), 4.68(d, J=18.3Hz, 1H), 4.78(ddd, J=12.1, 6.1, 1.8Hz, 1H), 5.26(t, J=11.0Hz, 1H), 5.78(dt, J=15.3, 6.1Hz, 1H), 6.04(ddd, J=15.3, 11.0Hz, 1H), 6.15(t, J=11.0Hz, 1H), 6.47(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.6(q), 44.0(t), 44.6(t), 45.2(t), 65.4(d), 71.6(d), 104.0(d), 114.3(s), 115.9(s), 128.4(d), 129.0(d), 130.5(d), 133.9(d), 135.1(s), 157.3(s), 157.7(s), 168.7(s), 206.3(s)

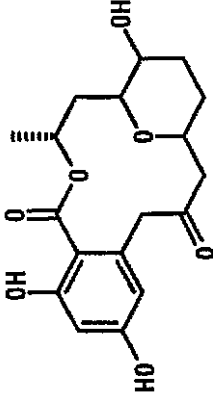
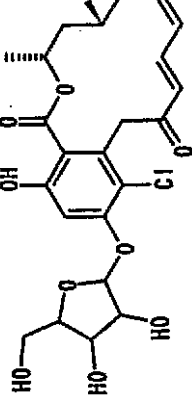
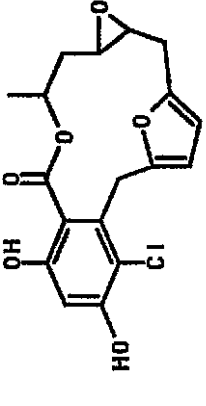
化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
72		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.34(d, J=6.1Hz, 3H), 1.73(ddd, J=14.0, 10.0, 3.4Hz, 1H), 2.20(ddd, J=14.0, 11.6, 5.5Hz, 1H), 3.06(dd, J=15.5, 8.2Hz, 1H), 3.29(ddd, J=15.5, 6.7, 1.8Hz, 1H), 3.91(d, J=18.3Hz, 1H), 4.14(sxt, J=5.9Hz, 1H), 4.48(d, J=18.3Hz, 1H), 5.03(dq, J=6.1, 3.4Hz, 1H), 5.64(m, 1H), 5.65(m, 1H), 6.10(dd, J=14.9, 10.7Hz, 1H), 6.18(t, J=10.7Hz, 1H), 6.47(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.6(q), 42.5(t), 42.7(t), 45.0(t), 71.3(d), 71.8(d), 104.1(d), 113.4(s), 116.0(s), 124.9(d), 128.2(d), 132.1(d), 135.8(s), 136.9(d), 157.9(s), 158.5(s), 168.9(s), 208.3(s)
73		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.40(d, J=6.7Hz, 3H), 1.43(m, 1H), 1.60(m, 1H), 1.77(m, 1H), 1.80(m, 1H), 1.89(m, 1H), 1.99(m, 1H), 2.10(m, 1H), 2.43(m, 1H), 2.69(m, 1H), 2.83(m, 1H), 3.75(m, 1H), 4.17(d, J=18.3Hz, 1H), 4.25(d, J=18.3Hz, 1H), 5.25(d-qui, J=6.7, 3.0Hz, 1H), 6.42(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 19.2(q), 31.5(t), 37.8(t), 38.3(t), 39.6(t), 47.5(t), 55.2(d), 55.7(d), 68.2(d), 72.6(d), 104.0(d), 110.0(s), 116.1(s), 136.5(s), 159.2(s), 162.4(s), 170.8(s), 209.2(s)
74		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.36(d, J=6.7Hz, 3H), 1.75-1.84(m, 2H), 2.03(ddd, J=15.3, 7.3, 1.8Hz, 1H), 2.10(ddd, J=15.9, 7.9, 3.0Hz, 1H), 2.29(ddd, J=19.5, 6.7, 3.0Hz, 1H), 2.54(ddd, J=19.5, 9.8, 3.0Hz, 1H), 3.92(sxt, J=4.9Hz, 1H), 4.08(d, J=17.7Hz, 1H), 4.27(dt, J=9.8, 2.4Hz, 1H), 4.37(d, J=17.7Hz, 1H), 5.33(dd, J=15.3, 8.5Hz, 1H), 5.43(dd, J=15.3, 8.5Hz, 1H), 5.49(qui, J=6.7Hz, 1H), 6.47(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.6(q), 29.3(t), 38.0(t), 43.2(t), 47.4(t), 70.9(d), 71.7(d), 73.7(d), 104.1(d), 108.1(s), 116.6(s), 134.6(d), 135.1(d), 137.3(s), 159.9(s), 163.9(s), 171.6(s), 207.7(s)

10

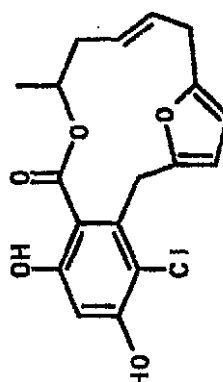
20

30

40

化合物番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
75		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.34(d, J=6.7Hz, 3H), 1.58(ddd, J=15.5, 7.3, 4.3Hz, 1H), 1.74(m, 1H), 1.91(m, 1H), 1.94(m, 1H), 2.05(m, 1H), 2.18(dt, J=15.5, 2.4Hz, 1H), 2.40(dd, J=15.5, 4.0Hz, 1H), 2.65(dd, J=15.5, 10.0Hz, 1H), 3.42(ddd, J=10.0, 7.3, 2.4Hz, 1H), 3.58(m, 1H), 3.85(d, J=18.3Hz, 1H), 4.27(d, J=18.3Hz, 1H), 4.38(ddd, J=13.4, 6.7, 3.0Hz, 1H), 5.32(m, 1H), 5.98(d, J=2.4Hz, 1H), 6.14(d, J=2.4Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 19.0(q), 29.2(t), 31.5(t), 41.1(t), 47.9(t), 52.7(t), 72.9(d), 73.0(d), 77.2(d), 83.0(d), 102.9(d), 108.2(s), 113.0(d), 139.2(s), 163.2(s), 165.1(s), 171.8(s), 208.6(s)
76		(CD3OD, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.52(d, J=6.1Hz, 3H), 1.65(ddd, J=14.6, 8.5, 3.7Hz, 1H), 2.43(dt, J=14.6, 3.7Hz, 1H), 3.06(dt, J=8.5, 2.4Hz, 1H), 3.35(m, 1H), 3.64(dd, J=12.2, 3.7Hz, 1H), 3.68(dd, J=12.2, 3.7Hz, 1H), 3.92(d, J=16.5Hz, 1H), 4.01(d, J=16.5Hz, 1H), 4.08(dd, J=6.7, 3.0Hz, 1H), 4.17(dd, J=6.7, 3.0Hz, 1H), 4.22(dd, J=6.7, 4.9Hz, 1H), 5.38(m, 1H), 5.64(d, J=4.9Hz, 1H), 5.75(dd, J=10.4, 4.3Hz, 1H), 6.06(d, J=15.9Hz, 1H), 6.20(t, J=10.4Hz, 1H), 6.85(s, 1H), 7.57(dd, J=15.9, 10.4Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) $\delta$ ppm: 18.7(q), 37.9(t), 46.3(t), 56.5(d), 56.8(d), 63.1(t), 71.0(d), 72.3(d), 73.5(d), 88.4(d), 103.3(d), 105.3(d), 117.1(s), 117.2(s), 130.9(d), 131.7(d), 134.4(s), 137.2(d), 140.7(d), 156.6(s), 157.8(s), 168.4(s), 199.1(s)
77		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.38(ddd, J=14.0, 9.2, 3.7Hz, 1H), 1.40(d, J=6.1Hz, 1H), 2.13(dd, J=15.3, 7.9Hz, 1H), 2.38(ddd, J=14.0, 11.0, 4.3Hz, 1H), 2.75(ddd, J=8.5, 3.7, 1.8Hz, 1H), 2.94(ddd, J=8.5, 3.7, 2.4Hz, 1H), 3.24(dd, J=15.3, 3.7Hz, 1H), 4.24(d, J=15.3Hz, 1H), 4.58(d, J=15.3Hz, 1H), 5.15(d-sxt, J=6.1, 3.7Hz, 1H), 5.50(br.d, J=2.4Hz, 1H), 6.17(br.d, J=2.4Hz, 1H), 6.52(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 20.5(q), 28.6(t), 32.1(t), 38.3(t), 54.9(d), 56.5(d), 72.3(d), 103.6(d), 107.3(d), 108.3(d), 113.7(s), 114.7(s), 137.6(s), 150.4(s), 151.7(s), 156.4(s), 156.9(s), 168.3(s)



化合物 番号	構造	1H-NMR	13C-NMR
78		(Acetone-d6, 500MHz) $\delta$ ppm: 1.38(d, J=6.1Hz, 3H), 2.25(dt, J=13.7, 10.7Hz, 1H), 2.39(dd, J=13.7, 4.6Hz, 1H), 3.18(d, J=7.3Hz, 2H), 4.17(d, J=14.3Hz, 1H), 4.58(d, J=14.3Hz, 1H), 5.40(m, 1H), 5.42(d-qui, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 5.61(ddd, J=15.2, 10.4, 4.6Hz, 1H), 5.86(d, J=3.0Hz, 1H), 6.08(d, J=3.0Hz, 1H), 6.47(s, 1H)	(Acetone-d6, 125MHz) $\delta$ ppm: 21.1(q), 27.9(t), 31.4(t), 39.9(t), 71.7(d), 103.2(d), 106.4(d), 107.1(d), 113.5(s), 114.4(s), 128.3(d), 131.7(d), 138.8(s), 151.7(s), 151.9(s), 156.2(s), 156.7(s), 167.0(s)

10

20

30

40

#### 試験例 1 毛乳頭細胞における WNT - 5 A mRNA の発現

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12% FBS を添加した MEM (インビトロジェン) を用いて培養した。ヒト毛包角化細胞は、荒瀬らの方法 (J. Dermatol. Sci. 2, 66-70 (1991)) に従って、抜毛髪から分離し KGM-2 (三光純薬) を用いて培養した。

50

継代5回目の毛乳頭細胞及び継代2回目の毛包角化細胞を、 $2 \times 10^6$  cells/wellとなるように10cmシャーレに播種し、二晩培養した。培地を除去し、細胞をPBS(-)で洗浄後、TRIzol試薬(インビトロジェン)を用いてtotal RNAを抽出した。各total RNA 50ng、WNT-5A又はglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)特異的なプライマー(WNT-5A forward: AATGTCCTTCCAAGTTCCTCCTAGTGGC(配列番号8)、WNT-5A reverse: GATGTCGGAATTGATACTGGCA(配列番号9)、GAPDH forward: ACCACAGTCCATGCCATCAC(配列番号10)、GAPDH reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTA(配列番号11))各0.4 $\mu$ M、及びSUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq(インビトロジェン)を用いて、SUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq添付のプロトコールに従い、全量25 $\mu$ lの反応系で、50 $^{\circ}$ Cで30分間first strand合成を行った後、94 $^{\circ}$ Cで2分間加熱、その後、94 $^{\circ}$ Cで30秒、55 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで30秒を23又は20サイクル繰り返し、各cDNA断片を増幅した。

この反応液を、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色した。結果を図1に示す。

毛乳頭細胞(DPC)由来のRNAを用いた場合は、WNT-5A特異的なプライマーを用いた23サイクルのPCRにおいて、顕著なcDNA断片の増幅が認められた。一方、毛包角化細胞(HFC)由来のRNAを用いた場合は、同条件において、増幅産物は認められなかった。

#### 試験例2 WNT-5A mRNA量減少活性の測定

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12%FBSを添加したMEM(インビトロジェン)を用いて培養した。

継代5回目の毛乳頭細胞を、 $1.6 \times 10^5$  cells/wellとなるように12穴プレートに播種し、一晚培養した。化合物無添加培地、又は化合物1、2、3、4、5、7、9又は24添加培地と交換し、更に24時間、培養を行った。培養終了時、培地を除去し、細胞をPBS(-)で洗浄後、TRIzol試薬(インビトロジェン)を用いてtotal RNAを抽出した。各total RNA 50ng、WNT-5A又はGAPDH特異的なプライマー(WNT-5A forward: AATGTCCTTCCAAGTTCCTCCTAGTGGC(配列番号8)、WNT-5A reverse: GATGTCGGAATTGATACTGGCA(配列番号9)、GAPDH forward: ACCACAGTCCATGCCATCAC(配列番号10)、GAPDH reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTA(配列番号11))各0.4 $\mu$ M、及びSUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq(インビトロジェン)を用いて、SUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq添付のプロトコールに従い、全量25 $\mu$ lの反応系で、50 $^{\circ}$ Cで30分間first strand合成を行った後、94 $^{\circ}$ Cで2分間加熱、その後、94 $^{\circ}$ Cで30秒、55 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで30秒を23又は20サイクル繰り返し、WNT-5A又はGAPDHのcDNA断片を増幅した。

この反応液を、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色した。結果を図2に示す。

WNT-5A特異的なプライマーを用いた23サイクルのPCRにおいて、化合物無添加で培養した場合と比較して、化合物を添加した培養では、WNT-5A cDNA断片の増幅が顕著に減少した。

一方、GAPDH特異的なプライマーを用いた20サイクルのPCRにおいて、GAPDH cDNA断片の増幅は、化合物の添加の有無に関わらず、変動が認められなかった。

#### 試験例3 毛乳頭細胞増殖促進活性試験

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12%FBSを添加したMEM(インビトロジェン)を用いて培養した。

ン)を用いて培養した。

継代5回目の毛乳頭細胞を、 $1.5 \times 10^4$  cells/wellとなるようにスフェロイド培養用96穴プレートに播種し、一晚培養した。化合物無添加培地、又は化合物1、2、3、4、5、7、9又は24添加培地と交換し、更に72時間培養を行った。培養終了時の細胞数をCell counting kit (和光純薬)を用いて測定した。即ち、培養終了5時間前に培地の1/10量のWST-1試薬を培地に添加し、培養終了時、培地の吸光度(O.D. 450nm/620nm)を測定した。細胞数と吸光度は、細胞数 $0.25 \sim 4 \times 10^4$  cells/wellの範囲で正の相関関係が認められた。その結果、WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物が、毛乳頭細胞の増殖を促進する活性を有することが明らかになった(図3)。図中の値は、対照群6well、化合物添加群3wellの平均値である。対照群と化合物添加群との比較にはスチューデントのt検定を用いた。

10

\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$

上記実験例により、WNT-5Aがヒト毛乳頭細胞に発現していること、ヒト毛乳頭細胞のWNT-5A mRNA量が本発明に係る化合物により減少すること、更に、WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物が、毛乳頭細胞の増殖を促進する活性を有することが示された。

試験例4：化合物(表2)のWNT-5A mRNA量減少活性(Quantigene法によるmRNAの定量)

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12% FBSを添加したMEM(インビトロジェン)を用いて培養した。

20

継代5回目の毛乳頭細胞を、 $1 \times 10^4$  cells/wellとなるように96穴プレートに播種し、一晚培養した。化合物無添加培地、又は化合物添加培地と培地交換し、更に24時間、培養を行った。培養終了後、Quantigene High Volume Kit(バイエルメディカル)を用いて、Branched DNA(bDNA) Signal Amplification法(Drug Metabolism and Disposition 28(5), 608-616(2000))により、WNT-5A又はGAPDHのmRNA量を定量した。即ち、Quantigene High Volume Kit添付のプロトコールに従い、Lysis Mixtureを用いて細胞を溶解し、溶解液をCapture plateに添加した。更に、WNT-5A又はGAPDH特異的なプローブセットを添加し、53で20時間、反応させた。0.03% Lauryl Sulfateを含む $0.1 \times$  SSCを用いてプレートを洗浄後、bDNAからなる増幅プローブを添加し、46で1時間反応させた。プレートを洗浄後、続いてAlkaline Phosphatase標識した標識プローブを添加し、46で1時間反応させた。プレートを洗浄後、基質Lumi-Phos Plusを添加し、46で30分間反応後、化学発光量をWALLAC 1420 ARVO<sub>SX</sub>を用いて測定した。

30

WNT-5A特異的なプローブセットは、ヒトWNT-5A mRNAの蛋白質翻訳領域の塩基配列に基づいて設計した。Capture Extender(CE)として10本のプローブ(配列番号12-21)を、Label Extender(LE)として31本のプローブ(配列番号22-52)を、Blockerとして9本のプローブ(配列番号53-60)を使用した。

40

また、GAPDH特異的なプローブセットとして、bDNA probe set for human GAPDH(XenoTech LLC, B0960)を使用した。

WNT-5A及びGAPDHのmRNA量は、化合物無添加対照に対する相対値(%)として表し、mRNA量を50%に減少させる化合物濃度(IC<sub>50</sub>値)を算出して、化合物によるmRNA減少活性の指標とした。

WNT-5A及びGAPDHのmRNA量に及ぼす化合物の影響を表3に示す。表中の値は2wellの平均値である。これらの化合物は、毛乳頭細胞において、WNT-5A mRNA量を減少させた。最も活性の強い化合物のIC<sub>50</sub>値は $0.12 \mu\text{M}$ であった。

50

WNT-5A mRNA量減少のIC<sub>50</sub>値においては、同時に測定したGAPDH mRNA量には減少が認められなかった。

表3

化合物番号	IC <sub>50</sub> (μM)	
	WNT-5A	GAPDH
1	0.20	28.25
2	0.39	26.41
3	3.16	57.95
4	3.46	>30
5	3.47	>30
7	4.07	>120
18	0.63	6.58
24	4.74	21.07
35	0.46	4.29
38	6.42	>120
52	0.12	13.47
53	0.12	45.45
54	2.37	>30
55	0.74	>30
58	0.50	79.95
65	8.28	109.16
68	10.69	50.63
73	9.37	>120
76	8.56	55.94
77	8.13	>120
79	0.90	38.16

10

20

30

試験例5：化合物(表2)の毛乳頭細胞増殖促進活性

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12% FBSを添加したMEM(インビトロジェン)を用いて培養した。

継代5回目の毛乳頭細胞を、 $1.5 \times 10^4$  cells/wellとなるようにスフェロイド培養用96穴プレートに播種し、一晚培養した。化合物無添加培地、又は化合物添加培地と交換し、更に72時間、培養を行った。培養終了時の細胞数をCell counting kit(和光純薬)を用いて測定した。即ち、培養終了5時間前に培地の1/10量のWST-1試薬を培地に添加し、培養終了時、培地の吸光度(O.D. 450nm/620nm)を測定した。細胞数と吸光度は、細胞数 $0.25 \sim 4 \times 10^4$  cells/wellの範囲で正の相関関係が認められた。

40

WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物が、毛乳頭細胞の増殖に及ぼす影響を、表4に示す。表中の値は、対照群6well、化合物添加群3wellの平均値である。対照群と化合物添加群との比較にはスチューデントのt検定を用いた。

\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.001$

WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物はいずれも、16 μMにおいて顕著な

50

毛乳頭細胞増殖促進活性を示した。IC<sub>50</sub>値が1 μM未満の、強いWNT-5A mRNA減少活性を示す化合物1, 2, 18, 35, 52, 53, 及び58については、1 μMにおいても有意な増殖促進活性を示した。

表4

化合物番号	ΔO.D. 450nm/620nm (% of control)					
	1		4		16 (μM)	
1	132.9	± 11.6 ***	183.7	± 12.1 ***	144.7	± 13.0 ***
2	142.6	± 10.1 ***	167.3	± 8.5 ***	241.0	± 25.3 ***
3	92.9	± 1.6	92.9	± 9.9	244.2	± 33.4 ***
4	97.4	± 24.4	148.2	± 4.9 ***	180.2	± 6.9 ***
5	110.2	± 45.0	174.7	± 29.2 ***	236.4	± 26.4 ***
7	82.6	± 3.9	169.7	± 10.4 ***	194.8	± 12.7 ***
18	115.6	± 9.0 *	147.1	± 11.3 ***	210.9	± 25.9 ***
24	108.2	± 6.9	104.3	± 10.5	119.7	± 3.7 **
35	160.8	± 3.5 ***	181.6	± 3.7 ***	158.6	± 18.3 ***
38	103.5	± 2.6	89.6	± 7.3	124.9	± 5.1 **
52	124.5	± 1.0 ***	143.2	± 9.5 ***	197.0	± 5.4 ***
53	126.6	± 14.3 **	149.5	± 12.8 ***	184.4	± 3.6 ***
54	80.0	± 2.4	97.1	± 5.6	135.0	± 0.9 ***
55	89.0	± 1.8	126.9	± 7.2 ***	175.6	± 9.8 ***
58	123.3	± 1.8 ***	150.4	± 9.4 ***	217.4	± 14.5 ***
65	92.1	± 6.7	87.6	± 8.7	141.0	± 5.3 ***
73	91.7	± 5.7	81.2	± 7.8	205.6	± 9.2 ***
76	80.0	± 5.6	77.1	± 7.0	120.7	± 6.3 *
77	81.6	± 4.4	86.3	± 5.0	180.8	± 21.7 ***
79	87.5	± 9.9	98.6	± 3.6	120.0	± 4.1 **

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001

試験例6：サル皮膚器官培養におけるWNT-5A mRNAの減少

カニクイザル(オス、6年齢)の背部皮膚を採取し、実体顕微鏡下で5mm×8mmに分割後、各皮膚組織片を、化合物無添加又は化合物7若しくは化合物3を添加した、10 μg/mlのInsulin(シグマ)、10 ng/mlのHydrocortisone(クラボウ)を含むWilliams' Medium E(インビトロジェン)を用いて培養した。

培養11日目に皮膚組織片から毛包を分離し、TRIzol試薬(インビトロジェン)を用いてtotal RNAを抽出した。各total RNA 200 ng、WNT-5A又はGAPDH特異的なプライマー(WNT-5A sense: AATGTCCTTCC AAGTTCCTTCTAGTGGC(配列番号8)、WNT-5A antisense: GATGTCGGAATTGATACTGGCA(配列番号9)、GAPDH sense: ACCACAGTCCATGCCATCAC(配列番号10)、GAPDH antisense: TCCACCACCCTGTTGCTGTA(配列番号11))各0.4 μM、及びSUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq(インビトロジェン)を用いて、SUPERSCRIPT O

10

20

30

40

50

ne - Step RT - PCR with PLATINUM Taq 添付のプロトコールに従い、全量 25  $\mu$ l の反応系で、50 で 30 分間 first strand 合成を行った後、94 で 2 分間加熱、その後、94 で 30 秒、55 で 30 秒、72 で 30 秒を 40 又は 30 サイクル繰り返し、WNT - 5 A 又は GAPDH の cDNA 断片を増幅した。

この反応液を、1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動し、サイバークリーン I (タカラ) にて染色した。結果を図 4 に示す。

WNT - 5 A 特異的なプライマーを用いた 40 サイクルの PCR において、化合物無添加で培養した場合と比較して、化合物 7 又は化合物 3 を添加した培養においては、WNT - 5 A cDNA 断片の増幅が顕著に減少した。

10

一方、GAPDH 特異的なプライマーを用いた 30 サイクルの PCR において、GAPDH cDNA 断片の増幅は、化合物の添加の有無に関わらず、変動が認められなかった。  
試験例 7 : サル皮膚器官培養における Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 陽性細胞の増加

カニクイザル (オス、6 年 齢) の背部皮膚を採取し、実体顕微鏡下で 5 mm  $\times$  8 mm に分割後、各皮膚組織片を、化合物無添加又は化合物 7 若しくは化合物 3 を添加した、10  $\mu$ g/ml の Insulin (シグマ)、10 ng/ml の Hydrocortisone (クラボウ) を含む Williams' Medium E (インビトロジェン) を用いて培養した。

培養 30 日目に、皮膚組織片を 10% 中性ホルマリンを用いて室温で固定した。パラフィン切片を作製し、1% BSA 添加 PBS を加え室温で 30 分間放置し、更に 0.1 M のクエン酸緩衝液で煮沸処理を行った。抗 PCNA 抗体 (ダコジャパン、200 倍希釈) と 4 で一晩反応させ、続いてビオチン化抗マウス IgG 抗体を反応させた後、ABC standard kit (ベクター) と反応させ、AEC substrate (シグマ) を用いて発色させた。

20

その結果、毛包及び表皮基底層の細胞において、特異的なポジティブ反応が認められた。毛包においては、休止期毛包、成長期毛包のいずれにおいても、毛乳頭及びダーマルシースにおける PCNA 陽性細胞数が、化合物 7 又は化合物 3 の添加培養により顕著に増加した (図 5)。

試験例 8 : サル皮膚器官培養における毛球部径の増大

30

カニクイザル (オス、6 年 齢) の背部皮膚を採取し、実体顕微鏡下で 5 mm  $\times$  8 mm に分割後、各皮膚組織片を、化合物無添加又は化合物 7 若しくは化合物 3 を添加した、10  $\mu$ g/ml の Insulin (シグマ)、10 ng/ml の Hydrocortisone (クラボウ) を含む Williams' Medium E (インビトロジェン) を用いて培養した。

培養 30 日目に、各皮膚組織片に含まれる全ての毛包を分離し、毛球部の直径を実体顕微鏡下で測定した。

結果を図 6 及び 7 に示す。表中の数値は、各皮膚組織片に含まれる全ての毛包の毛球部径の平均値  $\pm$  s.e. である。対照群と化合物添加群との比較には学生 t 検定を用いた。\* : P < 0.05

40

また、図は毛球部径の分布を示すヒストグラムである。各皮膚組織片に含まれる全ての毛包を、図中に示した毛球部径のグループに各々分類し、各グループに分類された毛包の数を、組織片から分離した毛包総数に対する相対値 (%) で表した。図 6 は化合物 7 添加培養の影響を示す。化合物 7 の存在下で 30 日間培養した皮膚片に含まれる毛包の毛球部径の平均値は、化合物無添加対照と比較して有意に高値であった。分布をみると、化合物無添加対照においては 140  $\mu$ m 以上 170  $\mu$ m 未満の毛球部径を有する毛包が最も多かったが、化合物 7 添加においては 170  $\mu$ m 以上 200  $\mu$ m 未満の毛球部径を有する毛包の割合が最大であった。170  $\mu$ m 以上の毛球部径を有する毛包の割合は、化合物無添加対照では 57.6% であったが、化合物 7 添加では 82.4% に増加した。

一方、図 7 は化合物 3 添加培養の影響を示す。化合物 7 の場合と同様に、化合物 3 存在下

50

で30日間培養した皮膚片に含まれる毛包の毛球部径の平均値は、化合物無添加対照と比較して有意に高値であった。分布は、化合物無添加対照においては170 $\mu$ m以上200 $\mu$ m未満の毛球部径を有する毛包が最も多かったが、化合物3添加においては200 $\mu$ m以上230 $\mu$ m未満の毛球部径を有する毛包の割合が最大であった。170 $\mu$ m以上の毛球部径を有する毛包の割合は、化合物無添加対照では55.8%であったが、化合物3添加では74.5%に増加していた。

#### 実験例9：ベニガオザル発毛試験

脱毛症状が認められるベニガオザル（雄、14年齢）の前頭部に、化合物7を0.3%含むローション1mLを、1日1回、週5回、6ヶ月間、塗布投与した。塗布開始前に、前頭脱毛部にタトゥーによるマーキングを行い、タトゥーを含む同部位の皮膚拡大写真を、塗布開始前及び6ヶ月間塗布後に撮影した。

10

化合物7を含むローションの6ヶ月間塗布前後の皮膚拡大写真を、図8に示す。塗布前は、細かい軟毛が多いのに対し、6ヶ月間塗布後の同部位では、軟毛の数が減少し、太い硬毛の数の増加が認められた。化合物7を含むローションの6ヶ月間の塗布により、ベニガオザルの前頭部における脱毛症状に明らかな改善が認められた。

上記の実験例により、WNT-5Aがヒト毛乳頭細胞に発現していること、ヒト毛乳頭細胞のWNT-5A mRNA量が本発明に係る化合物により減少すること、更に、WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物が、毛乳頭細胞の増殖を促進する活性を有することが示された。

また、本発明に係る化合物は、サル皮膚器官培養においても、毛包のWNT-5A mRNA量を減少させること、休止期毛包、成長期毛包のいずれにおいてもPCNA染色陽性の増殖性細胞を顕著に増加させること、更に、毛包の毛球部径を増大させることが示された。

20

更に、本発明に係る化合物は、男性型脱毛症のモデル動物であるベニガオザルにおいて、脱毛症状の改善作用を有することが示された。

したがって、毛乳頭細胞の増殖を促進する化合物は、脱毛部毛包の毛乳頭において低下している細胞増殖能を亢進させることにより、発達した毛乳頭組織の形成に寄与し、その結果として発毛が促進される。

#### 産業上の利用可能性

WNT-5A機能阻害剤、例えば、WNT-5A mRNA量を減少させる活性を有する化合物又はその医薬上許容される塩は、毛乳頭細胞増殖活性を有し、新規な作用機序による発毛剤/育毛剤として有用である。

30

本発明は、WNT-5Aの機能を阻害する化合物が、脱毛症の改善剤若しくは予防剤になるという、今までにない全く新しい概念を提供するものであり、WNT-5Aの機能を阻害する化合物のスクリーニングは、新規な発毛剤/育毛剤の開発に有用である。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt;TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

&lt;120&gt;HAIR GROWTH PREPARATION

&lt;130&gt;P600

&lt;160&gt;61

&lt;150&gt;JP 2002-115529

&lt;151&gt;2002-04-17

10

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;365

&lt;212&gt;PROTEIN

&lt;213&gt;HOMO SAPIENS

&lt;400&gt;1

Met Ala Gly Ser Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val Ala Leu

20

5

10

15

Ala Ile Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser

20

25

30

Trp Trp Ser Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val

35

40

45

Tyr Ile Ile Gly Ala Gln Pro Leu Cys Ser Gln Leu Ala Gly Leu

30

50

55

60

Ser Gln Gly Gln Lys Lys Leu Cys His Leu Tyr Gln Asp His Met

65

70

75

Gln Tyr Ile Gly Glu Gly Ala Lys Thr Gly Ile Lys Glu Cys Gln

80

85

90

Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn

40

95

100

105

Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr

110

115

120



Ala Phe Thr Tyr Ala Val Ser Ala Ala Gly Val Val Asn Ala Met  
125 130 135

Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser Thr Cys Gly Cys Ser  
140 145 150

Arg Ala Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp Trp Leu Trp Gly  
155 160 165

Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Ala Lys Glu  
170 175 180

Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Glu Arg Ile His Ala Lys Gly Ser  
185 190 195

Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala  
200 205 210

Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys  
215 220 225

His Gly Val Ser Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln  
230 235 240

Leu Ala Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys Glu Lys Tyr  
245 250 255

Asp Ser Ala Ala Ala Met Arg Leu Asn Ser Arg Gly Lys Leu Val  
260 265 270

Gln Val Asn Ser Arg Phe Asn Ser Pro Thr Thr Gln Asp Leu Val  
275 280 285

Tyr Ile Asp Pro Ser Pro Asp Tyr Cys Val Arg Asn Glu Ser Thr  
290 295 300

Gly Ser Leu Gly Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu  
305 310 315

Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp  
320 325 330

10

20

30

40

Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His

335 340 345

Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp

350 355 360

Gln Phe Val Cys Lys

365

<210>2

10

<211>4428

<212>DNA

<213>HOMO SAPIENS

<400>2

ttaaggaat cegggctgct cttcccac tcggaagtggc ttcccacaca tgggctegta 60

aactgattat gaacatac agttaattc ggagctgcat tcccagctg ggcactctcg 120

cgcgctggtc cccggggcct cgcceccac cccctgccct tccctcege gtcctgeccc 180

cactctcac ccccegcgt ggcaccccg cctccttggc agcctctggc ggcagcgcgc 240

tccactegcc tccgtgctc ctctgcecca tggaaatta tctggctcca ctgttgcctc 300

ggcccagggt ggggagagga cggagggtgg ccgcagcggg ttcttgagtg aattaccag 360

gagggactga gcacagcacc aactagagag gggtcagggg gtcgggact cgagcgagca 420

ggaaggagge agcgcctggc accagggett tgactcaaca gaattgagac acgtttgtaa 480

tcgctggcgt gcccgcgca caggatecca gcgaaatec gatttcttgg tgaggttgcg 540

tgggtggatt aatttgaaa aagaaactgc ctatctctg ccatcaaaa actcacggag 600

gagaagcgea gtcaatcaac agtaactta agagacccc gatgctccc tggtttaact 660

tgtatgcttg aaaattatc gagaggaat aaacatctt tcttcttcc ctctccagaa 720

gtccattgga atattaagcc caggagtgc ttggggatg gctggaagtg caatgtctc 780

caagttctc ctagtggctt tggccatatt ttctctctc gcccaggttg taatigaagc 840

caattcttgg tggctgctag gtatgaataa cctgttcag atgtcagaag tataatatt 900

aggagcacag cctctctgca gccaaactggc aggacittct caaggacaga agaaactgtg 960

ccacttgtat caggaccaca tgcagtacat cggagaaggc gcgaagacag gcacaaaga 1020

20

30

40

atgccagiat caattccgac atcgacgggtg gaactgcagc actgtggata acacctctgt 1080  
ttttggcagg gtgatgcaga taggcagccg cgagacggcc ttcacatacg ccgtgagcgc 1140  
agcaggggtg gtgaacgcca igagccgggc gtgccgagag ggcgagctgt ccacctgcgg 1200  
ctgcagccgc gccgcgcgcc ccaaggacct gccgcgggac tggctctggg gcgctgcgg 1260  
cgacaacatc gactatggct accgctttgc caaggagttc gtggacgccc gcgagcggga 1320  
gcgcatccac gccaaaggct cctacgagag tgetcgcate ctcatgaacc tgcacaacaa 1380  
cgagccggc cgcaggacgg tgtacaacct ggctgatgtg gcctgcaagt gccatggggt 1440  
gtccggctca tntagcctga agacatgctg gctgcagctg gcagacttcc gcaaggtggg 1500  
tgatgccctg aaggagaagt acgacagcgc ggcggccatg cggctcaaca gccggggcaa 1560  
gttggtacag gtcaacagcc gcttcaacte gccaccaca caagacctgg tctacatcga 1620  
ccccagccct gactactgcg tgcgcaatga gaggaccggc tcgctgggca cgcagggccg 1680  
ctgtgcaac aagacgtcgg agggcatgga tggctgcgag ctcatgtgct gcggccgtgg 1740  
gtacgaccag ttcaagaccg tgcagacgga gcgctgccac tgcaagtccc actgggtcctg 1800  
ctacgtcaag tgcaagaagt gcacggagat cgtggaccag ttgtgtgca agtagtgggt 1860  
gccaccagc actcagcccc gctcccagga cccgcttatt tatagaaagt acagtgattc 1920  
tggttttgg ttttagaaa tttttttat ttttcccaa gaattgcaac cggaaccatt 1980  
tttttccctg ttaccatcta agaactctgt ggittattat taatattata attattattt 2040  
ggcaataatg ggggtgggaa ccacgaaaaa tttttttt gtggatcttt gaaaaggtaa 2100  
tacaagactt ctttiggata gtatagaatg aagggggaaa taacacatac cctaacctag 2160  
ctgtgtggga catggtacac atccagaagg taaagaaata catttcttt tctcaaaata 2220  
tgccatcata tgggatgggt aggttccagt tgaagaggg tggtagaaat ctattcacia 2280  
ttcagcttct atgacaaaa tgagttgtaa attctctggt gcaagataaa aggtcttggg 2340  
aaaacaaaac aaaacaaaac aaacctccct tcccagcag ggctgctagc ttgcttctg 2400  
cattttcaaa atgataattt acaatggaag gacaagaatg tcatattctc aaggaaaaaa 2460  
ggatatcac atgtctcatt ctctcaaat attccattg cagacagacc gtcatattct 2520  
aatagctcat gaaatttggg cagcagggag gaaagtcgcc agaaattaaa aaatttaaaa 2580  
ctcttatgtc aagatgttga ttggaagctg ttataagaat tgggattcca gatttgtaaa 2640  
aagaccccca atgattctgg acactagatt tttgtttgg ggaggttggc ttgaacataa 2700

10

20

30

40

atgaaatac ctgtatttc itaggatac ttggttagta aattataata gtagaaataa 2760  
tacaigaac ccaticacag gttctcagc ccaagcaaca aggtaattgc gtgccattca 2820  
gcacigcacc agagcagaca acctattga ggaaaaacag tgaatccac ctctctctc 2880  
acactgagcc ctctctgatt cctccgtgtt gtgatgtgat gctggccacg ttcccaaagc 2940  
gcagctccac tgggicccct ttggttgtag gacaggaat gaaacattag gagctctgct 3000  
tggaaaacag tteactactt agggattttt gtttctaaa acttttattt tgaggagcag 3060  
tagttttcta igttttaag acagaacttg gctaatgaa ttcacagagg tgttgcagcg 3120  
tatactgtt atgatccgt gtttagatta tccactcatg ctctctctat tgtactgcag 3180  
gtgtacctta aaactgttc cagtgtactt gaacagtgc attataagg ggggaaatgt 3240  
ggtttaaggg tgcctgatat ctcaaagct tttgtacata acatataat atatatacat 3300  
atataataat ataaatataa atatactca ttgcagccag tgatttagat ttacagctta 3360  
ctctgggggtt atctctctgt cttagacatt gtgtctctc actgcagtc agttgggatt 3420  
attccaaaag tttttigagt cttagcttg ggctgtggcc ccgctgigat cataacctga 3480  
gcacgacgaa gcaacctcgt ttctgaggaa gaagcttgag ttctgactca ctgaaatgcg 3540  
tgttgggttg aagatatctt ttttctttt ctgcctcacc ctttgtctc caacctccat 3600  
ttctgttcac ttgttggaga gggcattact tgttcgttat agacatggac gtttaagagat 3660  
attcaaaact cagaagcatc agcaatgitt ctctttctt agttcattct gcagaatgga 3720  
aacctatgcc tattagaaat gacagtactt attaattgag tccctaagga atattcagcc 3780  
cactacatag atagcttttt ttttttttt ttttttttaa taaggacacc tttttccaaa 3840  
caggccatca aatatgttct tatctcagac ttacgtgtt ttaaagttt ggaaagatac 3900  
acatctttc atacccccc ttaggaggtt gggtttcat atcacctcag ccaactgtgg 3960  
ctcttaattt attgcataat gataccaca tcagccaact gtggctcttt aatttatgca 4020  
ataatgatat tcacatcccc tcagttgcag tgaattgtga gcaaaagatc ttgaaagcaa 4080  
aaagcactaa ttagtttaaa atgtcacttt ttggttttt attatacaaa aacctatgaag 4140  
tactttttt atttgctaaa tcagattgtt ctttttagt gactcatggt tatgaagaga 4200  
gtttagtita acaatcctag ctlttaaaag aaactattta atgtaaaata ttctacatgt 4260  
cattcagata ttatgtatat ctcttagcct ttattctgta ctlttaatgt acatatttct 4320  
gtcttgcgtg atttgtatat ttcactggtt taaaaacaa acatcgaaag gcttaticca 4380

10

20

30

40

aatggaagat agaataataa ataaaacggt acttgtaaaa aaaaaaaaa 4428

<210>3

<211>2460

<212>DNA

<213>HOMO SAPIENS

<400>3

10

cgtaggcacgc gcggaagatt ctcagtgtec ttacagagtc atcttccctg agccccggaa 60

gtgttggaag acatttagcc cttctttgg gaaactcagt ttctgatcag aatttttgtt 120

ttaccctggg gttgacagtc tcgccagagg tctcatttca tactgtcitt tcggatctga 180

tcctcttggg aaacaggcgg ggatgttita ccttacagag ccgatgtatg tgtgagttcg 240

ctgtgagttc ttgagtgic tcaaacttgt ggggcctttt ctcggttgea ctgggatiga 300

agaggaaga ggccaaggt gttccgggc aagcggcggg gttaatgga gatgcgactc 360

20

gtgaggctct ctttccgat cccccctgg gacacctct gcctacctt acctgggagc 420

caggagacc caagtcttgg tgaccgatg ggcccgtct cagtggcct gggtcttggg 480

aactgggga cttccctgg gggcttggg ctgggagtgg gttcggittg tgtggcttcg 540

gctetaaaa agagatccgc tgtaatccgc cgaatctgtt atcaatttct ctgctgcttg 600

agccccgcc cagcgcccc gcccgccgg aagcttggaa agtgcacgc gccagcacca 660

atctgggccc ctgactegga aacatgtcgc agcgtgtgtg tctatggacg cgtgtgagtg 720

30

tgtaaagtg cagagtggt aatgtgtatg aigtgtgtgc acgcggcacc ggctgccctt 780

ggggagagtt gacttgcag cctgggctgc gcgagaagca gacttgcag cccacctcct 840

ccccggagg aaattgaca cttagggcgg ggggtggggag atagccggag cttctctctt 900

cctagctggg gaaaceccag atttccattc tccaggatgc gccccccagc ttgacagcgt 960

cttggggaca actggcctgg lgttggagcc ctgcttagca ggcgctgggg accacataag 1020

cattctctt tggagaagcc ccgaagegtc caggccaaag gggcggttc acggaagaaa 1080

40

aacctgcac gccctgagc gcatagcttt accagggtc cctaggtccc gcctcttggc 1140

ctttacggc acaggttcca agccaggctc tcccaccgc cttaaagagg ctcaccttcc 1200

tttcttttc tgtggaagg gctcttcag gggctatggc cgatgcagtg cggcagggtt 1260

agacttacgt gtaaggggat ttttaaaace cgctcctccc acccgcacce gccacctact 1320  
 cgctccgccc ccgcttacag gtggagaagt caccagtggg gaggaacggc agcggaagct 1380  
 tccaaggcca actectacce ctgaaattct tcaggaaggg aaccttcgcc gctggggggc 1440  
 tctttggcct ggaatcgatg cgcccagctg cggctcggaa gccagcgctt ctggccccgt 1500  
 ctggactcat ctgcaagggc tctggcctcg ccccgcaccc ccacctttcg ggactgaccg 1560  
 aaccaagtct gagttgggct ggagaggcta gactggaggc aggggtggcag agttccaacg 1620  
 acaggctcgc agtgcgcgca atggcaaagt gggccacaac cccagatcag gaccagaga 1680  
 aactggagtc tctctctggg cctcccattt cctcccctcc tggeaactac caggttgtgg 1740  
 ggtgggaggg agagtgaaa atcaagaatt tgggagaaag ctgtggggag ggcaggggaag 1800  
 ggatccttct ccccggggaa gcgagacceca gactccttcc ttctctctag ggttccatec 1860  
 ctctctctag tccgtggaag aggccacagg cgacgcgggc gagggtgga ctttttcca 1920  
 gtttcttgg ttgggagacc cgacctctct ctccattatc ccttagggee cccatecct 1980  
 tctcccctcc ctagtctggc tgaagaacgt ccttaaggaa atccgggctg ctcttcccca 2040  
 tctggaagtg gctttcccca cctggctcg taaactgatt atgaaacata cgatgtaat 2100  
 teggagctgc atttcccage tgggcactct cgcgcgctgg tccccggggc ctgccecccc 2160  
 acccctgce cttcccctcc gcgtcctgce cccatcctcc acccccgcg ctggccacce 2220  
 cgctccttg gcagcctctg gcggcagcgc gctccactcg cctcccgtgc tctctctgcc 2280  
 catggaatta attctggctc cacttgttgc tggcccagg ttggtgagag gacggagggt 2340  
 gccacagcg ggttctgag tgaattacce aggagggact gaggcacagca ccaactagag 2400  
 gggggccagg ggggtcggga ctcgagcgag caggaaggag gcagcgctg gcaccagggc 2460.

10

20

30

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;585

&lt;212&gt;PROTEIN

&lt;213&gt;HOMO SAPIENS

&lt;400&gt;4

40

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu

5

10

15

Leu Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ser Lys Ala

	20	25	30	
Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly				
	35	40	45	
Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln				
	50	55	60	
Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu				10
	65	70	75	
Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Thr Met Tyr				
	80	85	90	
Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys				
	95	100	105	
Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met				20
	110	115	120	
Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg				
	125	130	135	
Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr				
	140	145	150	
Asn Arg Ser Glu Ala Thr Thr Ala Pro Pro Arg Pro Phe Pro Ala				30
	155	160	165	
Lys Pro Thr Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro Ala Ser Gly Gly				
	170	175	180	
Glu Cys Pro Ala Gly Gly Pro Phe Val Cys Lys Cys Arg Glu Pro				
	185	190	195	
Phe Val Pro Ile Leu Lys Glu Ser His Pro Leu Tyr Asn Lys Val				40
	200	205	210	
Arg Thr Gly Gln Val Pro Asn Cys Ala Val Pro Cys Tyr Gln Pro				
	215	220	225	
Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr Phe Ala Thr Phe Trp Ile Gly				

	230	235	240	
Leu Trp Ser Val	Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ser Thr Thr Val Ala			
	245	250	255	
Thr Phe Leu Ile	Asp Met Asp Thr Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro			
	260	265	270	
Ile Ile Phe Leu	Ser Ala Cys Tyr Leu Cys Val Ser Leu Gly Phe			10
	275	280	285	
Leu Val Arg Leu	Val Val Gly His Ala Ser Val Ala Cys Ser Arg			
	290	295	300	
Glu His Asn His	Ile His Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys			
	305	310	315	
Thr Ile Val Phe	Leu Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser			20
	320	325	330	
Ile Trp Trp Val	Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Ala			
	335	340	345	
Met Lys Trp Gly	Asn Glu Ala Ile Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Phe			
	350	355	360	
His Leu Ala Ala	Trp Leu Ile Pro Ser Val Lys Ser Ile Thr Ala			30
	365	370	375	
Leu Ala Leu Ser	Ser Val Asp Gly Asp Pro Val Ala Gly Ile Cys			
	380	385	390	
Tyr Val Gly Asn	Gln Asn Leu Asn Ser Leu Arg Arg Phe Val Leu			
	395	400	405	
Gly Pro Leu Val	Leu Tyr Leu Leu Val Gly Thr Leu Phe Leu Leu			40
	410	415	420	
Ala Gly Phe Val	Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser Val Ile Lys Gln			
	425	430	435	
Gly Gly Thr Lys	Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Ile Arg Ile			



440	445	450	
Gly Ile Phe Thr Leu Leu Tyr Thr Val Pro Ala Ser Ile Val Val			
455	460	465	
Ala Cys Tyr Leu Tyr Glu Gln His Tyr Arg Glu Ser Trp Glu Ala			
470	475	480	
Ala Leu Thr Cys Ala Cys Pro Gly His Asp Thr Gly Gln Pro Arg			10
485	490	495	
Ala Lys Pro Glu Tyr Trp Val Leu Met Leu Lys Tyr Phe Met Cys			
500	505	510	
Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Ile Trp Ser Gly Lys			
515	520	525	
Thr Val Glu Ser Trp Arg Arg Phe Thr Ser Arg Cys Cys Cys Arg			20
530	535	540	
Pro Arg Arg Gly His Lys Ser Gly Gly Ala Met Ala Ala Gly Asp			
545	550	555	
Tyr Pro Glu Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Gly Pro Pro			
560	565	570	
Gly Pro Ala Ala Thr Tyr His Lys Gln Val Ser Leu Ser His Val			30
575	580	585	

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;2334

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;HOMO SAPIENS

&lt;400&gt;5

accagggac ggaggacceca ggctggcttg gggactgtct gctcttctcg gcgggagccg	60	40
tggagagtcc ttccctgga atccgagccc taaccgtctc tccccagccc tateccggcga	120	
ggagcggagc gctgccagcg gaggcagcgc ctccccgaag cagttttatct ttggacggtt	180	
tictttaaag gaaaaacgaa ccaacaggtt gccagccccg gcgccacaca cgagacgccg	240	

gagggagaag ccccggcccg gattcctctg cctgigtgcg tccctcgagg gctgctggag 300  
 gcgaggggag ggagggggcg atggctcggc ctgaccatc cgcgcgccc tcgctgittc 360  
 tgctgctcct ggcgagctg gtgggcccgg eggccgccc gtccaaggcc cgggtgtgcc 420  
 aggaaatcac ggtgccatg tgcccgggca tggctacaa cctgacgcac atgcccacc 480  
 agttcaacca cgacacgcag gacgaggcgg gcctggaggt gcaccagttc tgcccgctgg 540  
 tggagatcca atgctcgccg gacctgcct tcttctatg cactatgtac acgcccattc 600  
 gtctgcccga ctaccacaag ccgctgcgc cctgcccctc ggtgtgcgag cgcgccaagg 660  
 ccggctgctc gccgctgatg cgcagtagc gcttcgctg gcccgagcgc atgagctgcg 720  
 accgctccc ggtgctgggc cgcgacgccc aggtcctctg catggattac aaccgcagcg 780  
 aggccaccac ggccgcccc aggcctttcc cagccaagcc cacccttcca ggcccggcag 840  
 gggcgcccgc ctccgggggc gaatgcccc ctgggggccc gttcgtgtgc aagtgtcgcg 900  
 agcccttcgt gccattctg aaggagtcac acccgctcta caacaaggig cggacgggccc 960  
 aggtgcccaa ctgcgcggtg cctgctacc agccgtcctt cagtgcgcac gagcgcacgt 1020  
 tggccacctt ctggatagcc ctgtggtcgg tgcigtgctt catctccacg tccaccacag 1080  
 tggccacctt cctcatcgac atggacaegt tccgtatcc tgagcgcgcc atcatcttcc 1140  
 tgteagcctg ctacctgtgc gtgtcgctgg gcttccctgg gcgtctggtc gtgggccaatg 1200  
 ccagcgtggc ctgcagccc gagcacaacc acatccacta cgagaccacg ggccctgcac 1260  
 tgtgcacat cgtcttctc ctggctact tcttcggcat ggccagctcc atctgggtggg 1320  
 tcatectgtc gctcaactgg ttcttggccg ccgcgatgaa gtggggcaac gaggccatcg 1380  
 cgggetacgg ccagtactc cacttggctg cgtggctcat ccccagctc aagtccatca 1440  
 cggcactggc gctgagctcc gtggacgggg acccagtggc cggcactgc tactgtggca 1500  
 accagaacct gaactcgtg cggcgcttcg tgcctggccc gctgggtgct tacttgcctgg 1560  
 tgggcacgct ctctctgtg ggggcttcg tgctgctctt ccgcatccgc agcgtcatca 1620  
 agcagggcgg caccaagacg gacaagctgg agaagctcat gatccgcatc ggcatcttca 1680  
 cgtgtctcta cacggteccc gccagcattg tgggtggcctg ctacctgtac gagcagcact 1740  
 accgcgagag ctgggaggcg gcgctcaact gcgctgccc gggccacgac accggccagc 1800  
 cgcgcgcaa gcccgagtac tgggtgtca tgctcaagta ctcatgtgc ctgggtgggtg 1860  
 gcatcacgtc gggcgctctg atctggctgg gcaagacggt ggagtcgtgg cggcgttca 1920

10

20

30

40

ccagccgctg ctgctgccgc ccgcgccgcg gccacaagag cgggggcgcc atggccgcag 1980  
 gggactacc cagggcgagc gccgcgctca caggcaggac cgggcccgcg ggccccgcg 2040  
 ccacctacca caagcaggtg tccctgtcgc acgigttagga ggctgccgcc gagggactcg 2100  
 gccggagagc tgaggggagg ggggcgtttt gtttggtagt tttgccaagg tcacttccgt 2160  
 ttaccttcat ggtgctgttg cccctcccg cggcgacttg gagagagga agaggggcgt 2220  
 tttegaggaa gaacctgtcc caggctttct ccaaggggcc cagctcactg gtattctatt 2280  
 ttgcgtttct tacctgcctt cttaaggga accctctttt taatttatat gtat 2334

10

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;570

&lt;212&gt;PROTEIN

&lt;213&gt;RATTUS SP.

&lt;400&gt;6

Met Arg Ala Arg Ser Ala Leu Pro Arg Ser Ala Leu Pro Arg Leu  
                   5                  10                  15  
 Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gln Phe  
                   20                  25                  30  
 His Gly Glu Lys Gly Ile Ser Ile Pro Asp His Gly Phe Cys Gln  
                   35                  40                  45  
 Pro Ile Ser Ile Pro Leu Cys Thr Asp Ile Ala Tyr Asn Gln Thr  
                   50                  55                  60  
 Ile Met Pro Asn Leu Leu Gly His Thr Asn Gln Glu Asp Ala Gly  
                   65                  70                  75  
 Leu Glu Val His Gln Phe Tyr Pro Leu Val Lys Val Gln Cys Ser  
                   80                  85                  90  
 Pro Glu Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr Ala Pro Val Cys  
                   95                  100                 105  
 Thr Val Leu Glu Gln Ala Ile Pro Pro Cys Arg Ser Ile Cys Glu  
                  110                 115                 120

20

30

40

Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Ala Leu Met Asn Lys Phe Gly Phe	
125	130 135
Gln Trp Pro Glu Arg Leu Arg Cys Glu His Phe Pro Arg His Gly	
140	145 150
Ala Glu Gln Ile Cys Val Gly Gln Asn His Ser Glu Asp Gly Thr	
155	160 165
Pro Ala Leu Leu Thr Thr Ala Pro Pro Ser Gly Leu Gln Pro Gly	10
170	175 180
Ala Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Pro Pro	
185	190 195
Arg Tyr Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu	
200	205 210
Lys Val Pro Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp	20
215	220 225
Cys Ala Ala Pro Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe	
230	235 240
Phe Ser His His His Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr	
245	250 255
Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Phe Phe Thr Val Thr Thr	30
260	265 270
Ser Leu Val Ala Met Gln Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile	
275	280 285
Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr Met Val Ser Val Ala Tyr Ile	
290	295 300
Ala Gly Phe Val Leu Gln Glu Arg Val Val Cys Asn Glu Arg Phe	40
305	310 315
Ser Glu Asp Gly Tyr Arg Thr Val Gly Gln Gly Thr Lys Lys Glu	
320	325 330

Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe Phe Ser Met Ala		
335	340	345
Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala		
350	355	360
Ala Gly Met Lys Trp Gly His Ala Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln		
365	370	375
Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr Ile		10
380	385	390
Thr Ile Leu Ala Met Gly Gln Ile Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly		
395	400	405
Val Cys Phe Val Gly Leu Asn Arg Leu Asp Pro Leu Arg Gly Phe		
410	415	420
Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe		20
425	430	435
Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met		
440	445	450
Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu Pro Leu Glu Arg Leu Met Val		
455	460	465
Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile		30
470	475	480
Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg Glu His Trp		
485	490	495
Glu Arg Ser Trp Val Ser Gln His Cys Lys Ser Leu Ala Ile Pro		
500	505	510
Cys Pro Ala His Tyr Thr Pro Arg Thr Ser Pro Asp Phe Thr Val		40
515	520	525
Tyr Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser		
530	535	540

Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Leu His Ser Trp Arg Lys

545 550 555

Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser Arg His Gly Glu Thr Thr Val

560 565 570

<210>7

<211>1912

<212>DNA

<213>RATTUS SP.

<400>7

aggggaagge ggcggtctc tgggttgggg gcgggggctg gggggcgccc aggagccgag 60  
 tggggggcgg cggccagcat gcgggccgcg agcgccctgc cccgcagcgc cctgccccgc 120  
 ctgctgctgc cactgctgct gctgccggct gccgggcccgg ctcagttcca cggggagaag 180  
 ggcattcca tcccggacca cggcttctgc cagcccatct ccatcccgtt gtcacggac 240  
 atgcctaca accagacct caigcccaac ctcttgggc acacgaacca agaggacggc 300  
 ggctggagg tgcattcaati ctaccgcctg gigaaggigc agtgctgcc cgagctgcgc 360  
 ttctctgtt gctccatgta cgtccggig tgcacggigc tggagcagge catcccgcg 420  
 tgcgctcca tctggaacg cgcgcgcaa ggctgcgagg cgtcatgaa caagttcggc 480  
 ttccagtggc ccgagcgcct ccgctgcgag catttcccgc gtcacggcgc ggagcagatc 540  
 tgcgtgggce agaaccactc cgaggacgga actcctgcgc tactcaccac cgcgccaccg 600  
 tctgggctgc agcctggcgc tggiggcacc cggggcggcc ctggcggtgg tggcgcgcc 660  
 ccgcgtacg ccactctgga gcaccttct cactgtcccc gcgtctcaa ggtgccgtcc 720  
 tatctcagct ataagtctt gggtagcgc gattgtgcc cgccctgcga gctgcacgg 780  
 cccgacggct ccatgttctt ctgcaccac cacactggt ttgccctct ctggatctc 840  
 acatggtcgg tgcgtgctg cgttctact ttcttcacgg tcaccacctc tttagtggcc 900  
 atgcagcgt tccgtacc ccagcggccc atcatcttc tgcctggttg ctacaccatg 960  
 gtgtcagtgg cctacattgc gggcttcgtg ctccaggagc gcgtgggtgt caacgagcgc 1020  
 ttctctgagg acggttatcg cacggtgggg cagggcacta agaaagaagg ctgtactata 1080  
 ctcttcatga tgcctactt ctccagtaig gccagctcca tctgggtgggt gattctgtcc 1140

10

20

30

40

ctccacctggt tccigggcagc cggatgaag tggggccacg cggccatcga ggccaattcg 1200  
 cagtacttcc accigggccgc ctggggcggig cgggccgicg aaaccatcac catcctggcc 1260  
 atggggccaga tgcacggcga cctgcctgagc ggcgigigct tegtgggcct caacaggctg 1320  
 gaccgcctgc gaggettegt gctgggcggc ctcttegggt acctgttcat cggcacatcc 1380  
 ttctgtctgg cgggettegt gtcactcttc cgcatecgcg ccatcatgaa gcacgacggc 1440  
 accaagacgg agccgctgga gaggctcatg gtgcgtatcg gcgtcttctc cgtgctctac 1500  
 acctaccgg ccaaccatgt catgccttgc tacttctatg agcaggccct cgcgagcagc 1560  
 tgggagcgt cgtgggtaag ccagcactgc aagagcctag ccatcccctg cccggccccac 1620  
 tacagcccc gcacgtegcc cgacttcaca gtctacatga tcaaatacct catgaecctc 1680  
 atcgtgggca tcacgtcggg ctctctggatc tggctcggca agacgctgca ctctgtggagg 1740  
 aagtctaca cgcgtctcac caacagccgg catggagaga ccaccgtgtg aagcggctctc 1800  
 gctgtcgggc gccccctct cccaggctcg gactgcaacc gtgcccctct tcactcggga 1860  
 ggggggtgca ccctacggac tctattttta tttttttaa taaagaacag tg 1912

10

20

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;27

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;Designed nucleotide to act as a primer

30

&lt;400&gt;8

aagtcttcc aagtcttcc tagtggc

27

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;22

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

40

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;Designed nucleotide to act as a primer

&lt;400&gt;9

gatgtcggaa ttgatactgg ca	22	
<210>10		
<211>20		
<212>DNA		
<213>Artificial Sequence		
<220>		
<223>Designed nucleotide to act as a primer		10
<400>10		
accacagtcc atgccaatcac	20	
<210>11		
<211>20		
<212>DNA		
<213>Artificial Sequence		20
<220>		
<223>Designed nucleotide to act as a primer		
<400>11		
tccaccaccc tgitgctgta	20	
<210>12		
<211>38		30
<212>DNA		
<213>Artificial Sequence		
<220>		
<223>Designed nucleotide to act as a probe		
<400>12		
gtcctgggag cggggctttt ttctctigga aagaaagt	38	40
<210>13		
<211>46		
<212>DNA		



<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>13

agatttctta gatgtaaca ggaaatitit ctccttgaaa gaaagi 46

<210>14

<211>47

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>14

tatttcccc ttcattctat actatctitit tctcttggaa agaaagt 47 20

<210>15

<211>48

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe 30

<400>15

catagaagct gaattgtgaa tagatititit tctcttggaa aagaaagt 48

<210>16

<211>38

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>16

10

20

30

40

gccctgctgg ggaagggttt ttctcttggg aagaaagt

38

<210>17

<211>40

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

10

<400>17

cciccctgct gcccaaattt ttttctcttg gaaagaaagt

40

<210>18

<211>44

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

20

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>18

atcccaattc ttataacagc ttcttttctt ctiggaaaga aagt

44

<210>19

<211>43

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>19

cttggtgctt gggctgagaa actttttctc ttggaaagaa agt

43

40

<210>20

<211>44

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>20

ggctcagttg gaagaggaag gtttttctc ttggaaagaa agt 43

<210>21

<211>40

10

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>21

ccagtggagc tgccgtttgt ttttctcttg gaaagaaagt 40 20

<210>22

<211>49

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe 30

<400>22

cactgtactt tctataaata agcggttttt aggcatagga cccgtgtct 49

<210>23

<211>48

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>23

tttctaaaaa ccaaaaacca gaatTTTTTA ggcataggac ccgtgtct 48

<210>24

<211>43

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe 10

<400>24

aaaaatggtt ccggttgcatttttaggcattaggaccctgtct 43

<210>25

<211>57

<212>DNA

<213>Artificial Sequence 20

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>25

caaataataa ttataatatt aataataaac cactTTTTtag gcataggacc cgtgtct 57

<210>26

<211>51 30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>26

agatccacaa aataaatatt tttcgtgttt ttaggcatag gaccctgtct t 51 40

<210>27

<211>50

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>27

ccacacagct aagttagggt atgtgttttt taggcatagg acccgtgtct 50

<210>28

<211>49

10

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>28

ttaccttctg gatgtgtacc atgtcttttt aggcatagga cccgtgtct 49

<210>29

<211>47

20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>29

aacctacca tcccatatga tggtttttag gcataggacc cgtgtct 47

<210>30

<211>45

30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>30

40

ctaccacct cttcaactg gtttttagge ataggaccgg tgtct 45

<210>31

<211>47

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe 10

<400>31

ccagagaatt tacaactcat ttgggtttt taggcatagg acccgtgtct 50

<210>32

<211>47

<212>DNA

<213>Artificial Sequence 20

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>32

tccaagacc ttttatcttg catttttagg cataggaccg gtgtct 46

<210>33

<211>49 30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>33

aggtttgtti tgtttgtti tgttttttt aggcatagga cccgtgtct 49 40

<210>34

<211>47

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>34

gtccttccat tgtaaattat cattttgttt ttaggcatag gacccgigt t 51

<210>35

<211>49

10

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>35

ttttcctiga gaatatgaca ttcttttttt aggcatagga cccgtgtet 49 20

<210>36

<211>50

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe 30

<400>36

ggagaatgag acatgtgata taccittttt taggcatagg acccgtgtet 50

<210>37

<211>47

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>37

tctgtctgca aatggaatat ttgattttta ggcataggac cegtgtct 48  
<210>38  
<211>48  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<223>Designed nucleotide to act as a probe 10  
<400>38  
tcatgagcta ttagaatatg acggttttta ggcataggac cegtgtct 48  
<210>39  
<211>48  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence 20  
<220>  
<223>Designed nucleotide to act as a probe  
<400>39  
aatTTTTTaa tttctgggga cttttttta ggcataggac cegtgtct 48  
<210>40  
<211>52 30  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<223>Designed nucleotide to act as a probe  
<400>40  
aatcaacat cttagacataa gagttttatt tttaggcata ggaccctgt ct 52 40  
<210>41  
<211>46  
<212>DNA



<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>41

ggggctcttt tacaaatctg gatcttttagg cataggacc gtgtct 46

<210>42

<211>51

10

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>42

agaaaataca ggatattca tttatgttt ttaggcatag gaccctgtc t 51 20

<210>43

<211>56

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe 30

<400>43

tactattata attactaac caagtatccc tatcttttagg cataggacc gtgtct 56

<210>44

<211>51

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>44

ctgtgaatgg gattcatgta ttatttcttt ttaggcatag gacccgtgc t 51  
 <210>45  
 <211>44  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>Designed nucleotide to act as a probe 10  
 <400>45  
 gctgaatggc acgcaattac tttttaggca taggaccegt gtct 44  
 <210>46  
 <211>46  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence 20  
 <220>  
 <223>Designed nucleotide to act as a probe  
 <400>46  
 aggttgtctg ctctggtgca gttttttagg cataggacc gtgtct 46  
 <210>47  
 <211>47 30  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>Designed nucleotide to act as a probe  
 <400>47  
 cacaacacgg aggaatcaga gagtttttag gcataggacc cgtgtct 47 40  
 <210>48  
 <211>45  
 <212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>48

gaaacgtggc cagcatcaca ttttttaggc ataggacccg tgtct 45

<210>49

<211>45

10

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>49

tgtcctaca ccaaagggga ctttttaggc ataggacccg tgtct 45 20

<210>50

<211>46

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe 30

<400>50

gagctcctaa tgtttcattt ctttttagg cataggaccg gigtct 46

<210>51

<211>46

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

40

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>51

agtttttagga aacaaaaatc ccttttttagg cataggaccc gtgtct 46

<210>52

<211>49

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe 10

<400>52

gaaactact gctcctcaaa ataaatitit aggcatagga cccgtgtct 49

<210>53

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence 20

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>53

attcttgggg aaaaataaaa aata 24

<210>54

<211>20 30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>54

gttcccaccc ccattattgc 20 40

<210>55

<211>28

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>55

caaaagaagt cttgtattac cttttcaa

28

<210>56

<211>29

10

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>56

catattgag aaaaagaaaa tgtatttct

29

20

<210>57

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>57

aaaatgcaga aagcaagcta gca

23

30

<210>58

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>58

40

caaaaaatct agtgtccaga aicattg

27

<210>59

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

10

<400>59

tcaagccaac ctccccaaa

19

<210>60

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

20

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>60

ggatttcaact gtttttcctc aaat

24

<210>61

<211>25

30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Designed nucleotide to act as a probe

<400>61

taagtagtga actgttttcc aagca

25

40

【図面の簡単な説明】

図 1 は、毛乳頭細胞に WNT - 5 A mRNA が発現していることを示す電気泳動図を表す。

図 2 は、被検化合物が毛乳頭細胞において WNT - 5 A mRNA 量を減少させることを示す電気泳動図を表す。

図 3 は、被検化合物が毛乳頭細胞の増殖促進活性を有することを示すグラフを表す。

図 4 は、サル皮膚器官培養における WNT - 5 A mRNA の減少を示す電気泳動図である。

50

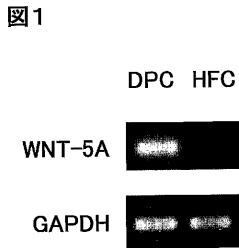
図5は、サル皮膚器官培養における休止期毛包及び成長期毛包のPCNA染色の結果を表す。

図6は、化合物7がサル皮膚器官培養における毛球部径を増大させることを示すヒストグラムを表す。

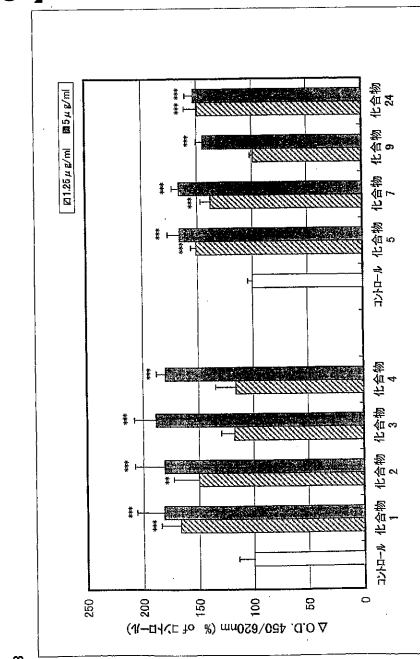
図7は、化合物3がサル皮膚器官培養における毛球部径を増大させることを示すヒストグラムを表す。

図8は、ベニガオザル発毛試験における6ヶ月間塗布前後の皮膚拡大写真を表す。

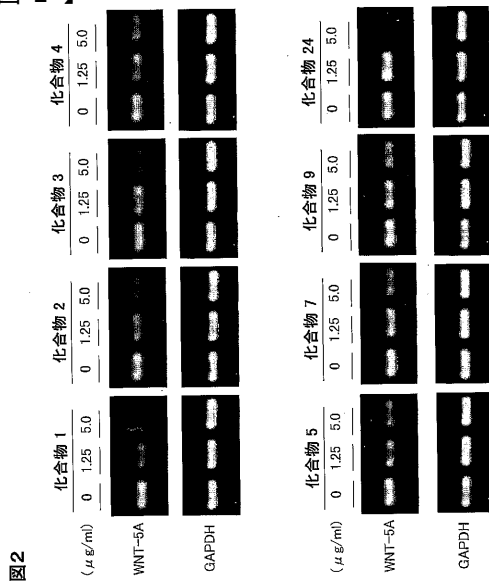
【 図 1 】



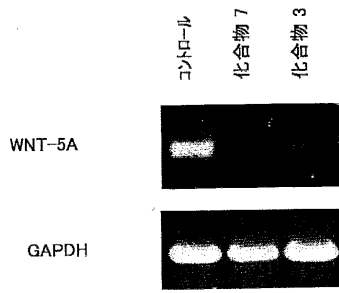
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】  
図4



【 図 5 】

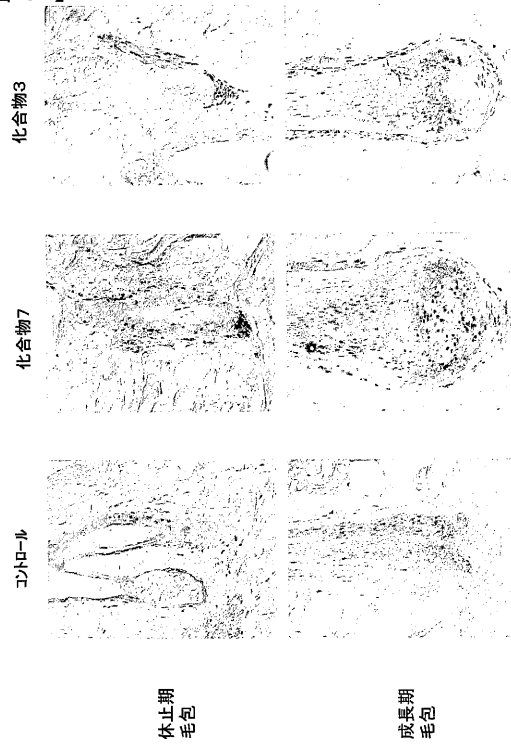


図5

【 図 6 】

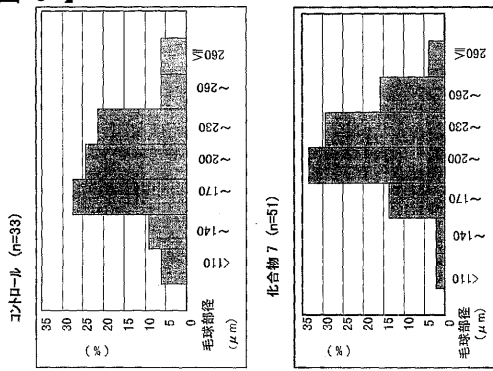


図6

平均

毛球部径 (μm)	
コントロール	178 ± 8
化合物 7	199 ± 5 *

\* <0.05

【 図 7 】

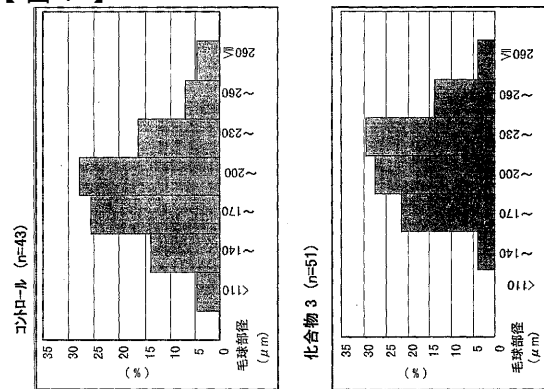


図7

平均

毛球部径 (μm)	
コントロール	177 ± 8
化合物 3	195 ± 5 *

\* <0.05

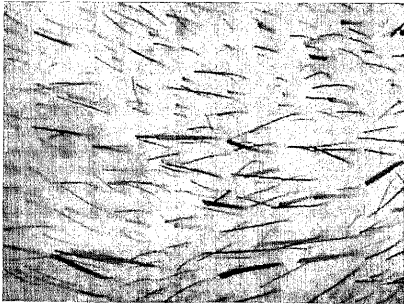


【 図 8 】  
図 8

塗布前



6ヶ月間塗布後



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP03/04884
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> A61K7/06, 45/00, A61P17/14, C07D271/08, 313/00, 493/04, 493/06, 493/08, 493/16  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A61K7/06-155, 45/00, C07D271/08, 313/00, 493/02-22  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/74164 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 11 October, 2001 (11.10.01), Full text	1-6, 8-10
X A	EP 606044 A1 (SANDOZ LTD.), 13 July, 1994 (13.07.94), Examples 8, 10 & JP 6-228122 A	3 1, 2, 4-6, 8-10
X A	JP 9-202781 A (Sankyo Co., Ltd.), 05 August, 1997 (05.08.97), Full text (Family: none)	3 1, 2, 4-6, 8-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 July, 2003 (10.07.03)		Date of mailing of the international search report 05 August, 2003 (05.08.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04884

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 3687982 A (Commercial Solvents Corp.), 29 August, 1972 (29.08.72), Full text & JP 47-29384 A                      & FR 2128316 A1 & DE 2210563 A1	3 1, 2, 4-6, 8-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04884

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 7  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 7 involves methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
See extra sheet.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04684

## Subject of the search

Claim 1 relates to a hair papilla cell growth promoter which contains as the active ingredient a compound defined by a desired property "an activity of inhibiting the function of WNT-5A", while claim 2 relates to a hair papilla cell growth promoter which contains as the active ingredient a compound defined by a desired property "inhibiting the production of WNT-5A". Although claims 1 and 2 involve any compounds having such properties, it is recognized that only parts of the claimed compounds are disclosed in the meaning as described in PCT Article 5 and thus these claims are not supported by the disclosure in the description in the meaning as described in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scopes of the "compound having an activity of inhibiting the function of WNT-5A" and the "WNT-5A production inhibitor" cannot be specified. Thus, claims 1 and 2 also fail to fulfill the requirement of clearness as described in PCT Article 6.

Such being the case, the search was made on the relationship between the inhibition of the function of WNT-5A and the promotion of hair papilla cell growth, the stimulation of hair growth or the hair growth, the compounds specifically presented in the description, and the hair papilla cell growth promoters, hair growth stimulants and hair growth tonics containing as the active ingredient the compounds as set forth in claims 4 to 6. Claims 4 to 6 were completely examined.

The same applies to the search on claims 8 to 10.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP03/04884	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K7/06, 45/00, A61P17/14, C07D271/08, 313/00, 493/04, 493/06, 493/08, 493/16			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K 7/06-155, 45/00, C07D271/08, 313/00, 493/02-22			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	WO 01/74164 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 2001.10.11 全文	1-6,8-10	
X A	EP 606044 A1 (SANDOZ LTD) 1994.07.13 実施例8及び10 & JP 6-228122 A	3 1,2,4-6,8-10	
X A	JP 9-202781 A (三共株式会社) 1997.08.05 全文 (ファミリーなし)	3 1,2,4-6,8-10	
X A	US 3687982 A (Commercial Solvents Corp.) 1972.08.29 全文 & JP 47-29384 A & FR 2128316 A1 & DE 2210563 A1	3 1,2,4-6,8-10	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 10.07.03		国際調査報告の発送日 05.08.03	
国際調査機関の名称及びびあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 大宅 郁治 電話番号 03-3581-1101 内線 3402	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/04884

## \*調査の対象について

請求の範囲1は「WNT-5Aの機能阻害活性」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする毛乳頭細胞増殖促進剤に関するものであり、また、請求の範囲2は「WNT-5A産生抑制」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする毛乳頭細胞増殖促進剤に関するものである。そして、請求の範囲1及び2は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物の一部分にすぎず、PCT6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「WNT-5Aの機能阻害活性を有する化合物」及び「WNT-5A産生抑制剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1及び2は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、WNT-5Aの機能阻害と毛乳頭細胞増殖促進又は発毛若しくは育毛との関係について、並びに、明細書に具体的に記載されている化合物及び請求の範囲4～6に記載されている化合物を有効成分とする毛乳頭細胞増殖促進剤、発毛剤、育毛剤について行った。また、請求の範囲4～6については、完全な調査を行った。

請求の範囲8～10に関しても同旨で調査を行った。

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/04884

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲7は、治療による人体の処置方法を包含するものであって、PCT17条(2)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 313/00	C 0 7 D 313/00	
C 0 7 D 493/04	C 0 7 D 493/04	1 1 1
C 0 7 D 493/08	C 0 7 D 493/08	C
C 0 7 D 493/18	C 0 7 D 493/18	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 15/00	A

(72) 発明者 葛西 陽子

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。