

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4135984号
(P4135984)

(45) 発行日 平成20年8月20日(2008.8.20)

(24) 登録日 平成20年6月13日(2008.6.13)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/661 (2006.01)	A 6 1 K 31/661
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00

請求項の数 23 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-523367
(86) (22) 出願日	平成9年11月21日(1997.11.21)
(65) 公表番号	特表2001-506594(P2001-506594A)
(43) 公表日	平成13年5月22日(2001.5.22)
(86) 国際出願番号	PCT/GB1997/003203
(87) 国際公開番号	W01998/022479
(87) 国際公開日	平成10年5月28日(1998.5.28)
審査請求日	平成16年11月4日(2004.11.4)
(31) 優先権主張番号	9624188.0
(32) 優先日	平成8年11月21日(1996.11.21)
(33) 優先権主張国	英国 (GB)

(73) 特許権者	アイティーシー・リサーチ・リミテッド イギリス国、スタッフオードシャー・エス ティー5・3エルエス、ニューキャッスル -アンダー-ライム、シーブリッジ・レイ ン、184番
(74) 代理人	弁理士 竹内 卓
(74) 代理人	弁理士 岡本 昭二
(72) 発明者	ドガディナ、アルピナ・ウラディミロウナ ロシア国、199406 セント・ペテル スブルク、ウル・ガバンスカヤ、48番、 アパートメント83号

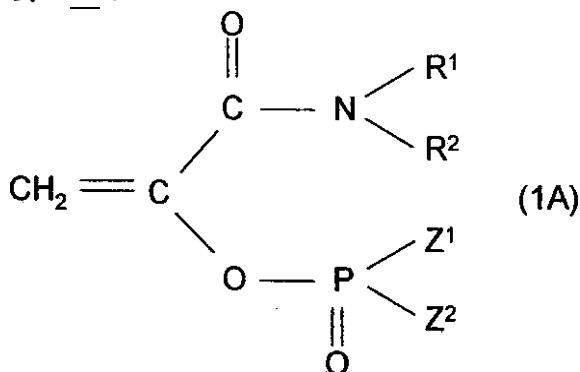
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式1 A:



[式中、R¹およびR²はそれぞれ、H、アルキル、アルケニル、アルコキシ(OR¹に適用される場合は除く)、シクロアルキル、アリール、またはアラルキルであり、Z¹およびZ²はそれぞれ、OR¹であり、ここでR¹はH、アルキル、アルケニル、アリール、またはアラルキルである。]

で示されるホスホエノールピルピン酸化合物、または薬理的に許容されるその塩、および薬理的に許容される担体を含んで成る医薬組成物。

【請求項2】

Z¹およびZ²がOHである請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

R¹およびR²はそれぞれ、HまたはC₁~C₆アルキルである請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

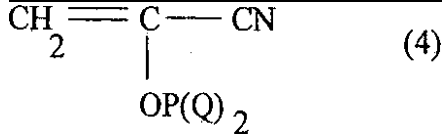
R¹およびR²がHである請求項3に記載の組成物、および薬理的に許容されるその塩。

【請求項5】

ホスホエノールピルビン酸化合物がカリウム塩である請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

ホスホエノールピルビン酸化合物が、式4：



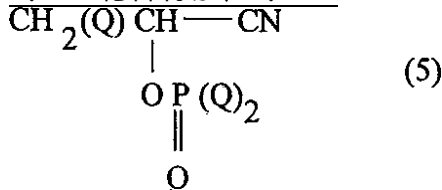
10

[式中、Qはハロゲンである。]

で示される化合物を加水分解して、該ホスホエノールピルビン酸化合物を形成することを
含んで成る請求項4に記載の組成物。

【請求項7】

式4の化合物が、式5：



20

[式中、Qは請求項6のものと同意義である。]

で示される化合物を、塩基で処理することによって製造される請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

式5の化合物が、アクリロニトリルの酸化ハロホスホリル化によって製造される請求項7
に記載の組成物。

【請求項9】

前記酸化ハロホスホリル化が、酸素ガスまたは酸素供与化合物の存在において、PCl₃
を使用して行われる請求項8に記載の組成物。

30

【請求項10】

塩基が第三級アミンである請求項7に記載の組成物。

【請求項11】

Qが塩素である請求項6~10のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項12】

虚血後の心筋回復を補助する心臓麻痺液である請求項1~11のいずれかに記載の組成物。

【請求項13】

再灌流傷害の治療のための再灌流液である請求項1~11のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項14】

医学療法において使用される請求項1~11のいずれかに記載のホスホエノールピルビン
酸化合物。

【請求項15】

ストレス下の体組織の回復を保護しおよび/または補助する薬剤の製造における、請求項
1~11のいずれかに記載のホスホエノールピルビン酸化合物の使用。

【請求項16】

体組織の生存能が低酸素症によって脅かされる請求項15に記載の使用。

【請求項17】

50

虚血に関連する症状の治療または予防のための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のホスホエノールピルビン酸化合物の使用。

【請求項 18】

症状が、心筋梗塞、敗血症性ショック、心原性ショック（および、心筋の ATP が減少する他の徴候）、四肢の切除、脳虚血による神経細胞損傷に関わる適応症、および損傷が末梢血管虚血に起因する適応症から選択される請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

薬剤が、心不全、溺れまたは薬剤過量摂取の結果としての脳虚血および心臓損傷を治療するためのものである請求項 17 または 18 に記載の使用。

【請求項 20】

虚血後の心筋回復を補助するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のホスホエノールピルビン酸化合物の使用。

【請求項 21】

肉体的または精神的疲労、循環不全、癌、および皮膚老化の徴候の治療または予防のための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のホスホエノールピルビン酸化合物の使用。

【請求項 22】

保存血液の生存能を強化するための、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のホスホエノールピルビン酸化合物の使用。

【請求項 23】

診断薬としての、ならびに炭水化物、グリコール、アルデヒドおよび ADP のような天然産物の酵素ホスホリル化のための、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のホスホエノールピルビン酸化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

本発明は、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) のある種のアミド誘導体、特に、細胞への虚血性損傷を予防するために特に使用されるアミド誘導体、ならびに、ある種のアミド誘導体および PEP の合成方法に関する。

体の器官への血流が局所要求に対して不十分であり、従って得られる酸素供給が大幅に減少する場合に、虚血性傷害 (insult) が結果として起こる。これは、結果的に細胞への虚血性損傷を招き、虚血が長時間にわたる場合には、最終的に器官の死を招く。虚血は通常、心臓に供給する動脈のような血管の疾患の結果であるが、冠状動脈バイパス接合 (grafting) または弁交換 (valve replacements) および移植手術、一般に心臓移植手術を含む心臓手術の間にも誘発される。

ホスホエノールピルビン酸 (PEP) は、酵素ピルビン酸キナーゼによって触媒されて、アデノシン二リン酸 (ADP) と結合して、ピルビン酸およびアデノシン - 5' - 三リン酸 (ATP) を生成する解糖基質である。それは、補助因子として Mg^{++} を、生理学的活性化物質としてアルカリ金属カチオン (例えば、 K^+) を必要とする細胞内条件下で不可逆性の発エルゴン反応である。その酵素は、フルクトース 1, 6 - ビスリン酸または PEP のような解糖中間体の増加によって、または低 ATP 濃度によって活性化され、高 ATP 濃度によって、あるいは脂肪酸またはアセチル CoA のような好氣的代謝物が利用可能な (available) 場合に、阻害される。

WO 83 / 02391 号は、PEP の水溶性塩および ATP の水溶性塩を含んで成る、虚血性細胞損傷を予防し治療するための、非経口投与の医薬組成物を開示している。PEP / ATP 組成物の適用範囲は、心臓切開手術または他の器官移植に使用される灌流液および保存液、ならびに心不全、溺れ (drowning) または薬剤過量摂取の結果としての脳虚血および心臓損傷の治療である。

同発明者らによる、PEP / ATP 組成物に関して記載している他の化学公表物は、Eur. Surg. Res. 15 : 200 ~ 207 (1983) ; Thorac. Cardiovasc. Surgeon 34 : 104 ~ 109 (1986) ; および、Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 21 : 245 ~ 249 (1987) である。これらの文献において、心臓麻痺液における PEP および ATP の組み合わせが、PEP 単独より優れた

10

20

30

40

50

X = O または NH、

Y = OH、OR¹、NR¹R² [式中、R¹およびR²はそれぞれ、H、アルキル、アルケニル (OR¹に適用される場合は除く)、シクロアルキル、アリール、またはアラルキルである。]

Z¹およびZ²はそれぞれ、OH、OR¹、NR¹R²である。]

で示される化合物、および薬理的に許容されるその塩であり、但し、

(i) XがOであり、Z¹およびZ²が両方ともOHである場合に、YはOHではなく；

(ii) XがOであり、YがNH₂である場合に、Z¹および/またはZ²は塩O⁻C₆H₁₁NH₃⁺ではなく；

(iii) XがNHであり、YがOHである場合に、Z¹およびZ²は両方ともOHではなく、または、Z²がNMe₂である場合に、Z¹はOMeではなく；および

(iv) XがOであり、YがOCH₂CH₃である場合に、Z¹およびZ²は両方ともNMe₂ではない；

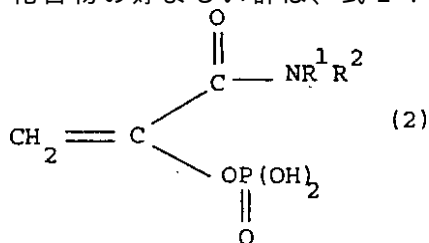
ことを条件とする。

式1の化合物およびそれらの塩は、以後「本発明の化合物」と称する。

条件 (i) ~ (iv) は、WO 83 / 02391号 (PEP)、Stubbeら、Shanniら、およびDespaxらによって公表されている化合物に対する権利を放棄するものである。

好ましくは (同時である必要はないが)、Xは酸素であり、YはNR¹R²であり、Z¹およびZ²はOH基である。

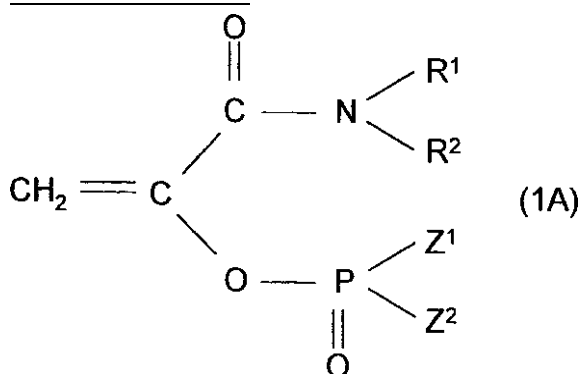
化合物の好ましい群は、式2：



[式中、R¹およびR²は式1のものと同意義である。]

で示される化合物である。

本発明は、式1A：



[式中、R¹およびR²はそれぞれ、H、アルキル、アルケニル、アルコキシ (OR¹に適用される場合は除く)、シクロアルキル、アリール、またはアラルキルであり、Z¹およびZ²はそれぞれ、OR¹であり、ここでR¹はH、アルキル、アルケニル、アリール、またはアラルキルである。]

で示されるホスホエノールピルピン酸化合物、または薬理的に許容されるその塩、および薬理的に許容される担体を含んで成る医薬組成物である。

式2に含まれる化合物のより好ましい群は、R¹およびR²がそれぞれHまたは低級アルキルであり、例えば、R¹がH、R²がメチルであり、R¹がH、R²がエチルであり、あるいはR¹およびR²が両方ともメチルまたはエチルである。

最も好ましい化合物は、式2で示される第一級アミド (即ち、R¹およびR²が両方ともH

10

20

30

40

50

である)、およびモノカリウム塩のようなカリウム塩である。IUPAC名称化合物(IUPAC name compound)は、2-(ジヒドロキシホスホリルオキシ)プロパ-2-エノイックアミド(ピルピンアミドエノールホスフェートとしても既知である)である。この化合物の構造は式3に示され、以後「式3の化合物」または「化合物3」と称する。

アルキルという語は、直鎖および分岐鎖アルキル基を包含し、低級アルキルという語は、1~6個、好ましくは1~4個の炭素原子を有する直鎖および分岐鎖アルキル基、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、s-ブチル、t-ブチル、ペンチルおよびヘキシルを包含する。

アルケニルという語は、直鎖であっても分岐鎖であってもよい2~7個の炭素原子を有する不飽和または部分飽和炭化水素基を意味する。

アルコキシという語は、6個までの炭素原子を有する低級アルコキシ基を意味する。

シクロアルキルという語は、7個までの炭素原子を有する炭化水素環を意味する。

アリールという語は、ベンゼノイド芳香族基を意味するが、好ましくはフェニルである。

アラキルという語は、1つまたはそれ以上のアルキル基で置換されているアリール基を意味する。

本発明の化合物は、特に虚血に関連する症状の治療において、ATPと一緒に投与するのが好ましい。

式1で示される生理学的に許容される塩、および生理学的に許容されるその誘導体の例は、適切な塩基、例えば、アルカリ金属(例えば、ナトリウムおよびカリウム)、アルカリ土類金属(例えば、マグネシウム)、アンモニウムおよび NX_4^+ (Xは C_{1-4} アルキルである。)から誘導される塩を包含する。アミノ基の生理学的に許容される塩は、有機カルボン酸、例えば、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、イセチオン酸、ラクトビオン酸および琥珀酸、有機スルホン酸、例えば、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸およびp-トルエンスルホン酸、ならびに、無機酸、例えば、塩酸、硫酸、リン酸およびスルファミド酸の塩を包含する。ヒドロキシ基の化合物の生理学的に許容される塩は、 NH_4^+ および NX_4^+ (Xは C_{1-4} アルキル基である。)のような好適なカチオンとの組み合わせにおける該化合物のアニオンを包含する。

アルカリ金属塩は、式2の化合物の特に好ましい塩であり、一般にカリウム塩である。

本発明の化合物は、機能的に損なわれた細胞、例えば、心臓組織、神経細胞組織(neuronal tissue)、移植の器官、皮膚(例えば、不全虚血皮膚弁)、および低酸素症によってその生存能が脅かされる筋肉(例えば、骨格筋)組織、の回復を保護しおよび/または補助する働きをする。心臓薬として、および心臓切開手術における心臓麻痺液として本発明の化合物を使用することによって、本発明の化合物は、虚血性細胞損傷また再灌流傷害の予防、保護または治療に特に適用できる。一般に、本発明の化合物は、ストレスまたは外傷(例えば、術後ストレス)下にある移植器官または体組織を保護しまたは保存するために、特に、虚血後の心筋回復を補助するために、使用することができる。本発明の化合物は、低体温条件下でさえ、前記のように作用する。

本発明の化合物によって治療することができる臨床適応症(clinical indications)は、心筋梗塞、敗血症性ショック、心原性ショック(および、心筋のATPが減少する他の徴候)、四肢の切除、脳虚血による神経細胞損傷に関わる適応症、および損傷が末梢血管虚血(例えば、血管閉塞)に起因する適応症である。

例えば、本発明の化合物は、心不全、溺れまたは薬剤過量摂取の結果としての脳虚血および心臓損傷を治療するために使用することができる。そのような場合、本発明の化合物を、直接注入(例えば、カテーテルを用いる)のための注入液の形態で使用して、損傷器官を治療することができる。

本発明の化合物の他の適用範囲は、心臓切開手術または器官移植におけるような、器官のための灌流液および保存液におけるそれらの使用である。

心臓手術または器官保存のための、心臓麻痺液、灌流液または再灌流液に使用される場合に、本発明の化合物(例えば、式3の化合物)の濃度は、好ましくは $10\ \mu\text{mol/L}$ ~ $50,000\ \mu\text{mol/L}$ であり、より好ましくは $50\ \mu\text{mol/L}$ ~ $1000\ \mu\text{mol/L}$ である。式3

10

20

30

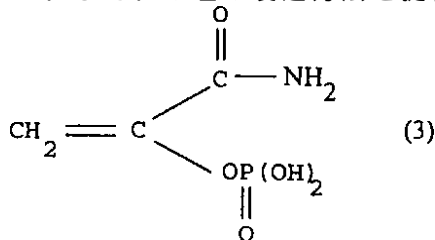
40

50

の化合物に関しては、 $100 \mu\text{mol/L}$ の濃度が適していることが見いだされた。
さらに重要な適用範囲は、血液保存および再生、または赤色血液細胞 (red blood cells) の回復である。従って、血液銀行は通常、血液を約5週間保存できるに過ぎないが、本発明の化合物、特に化合物3は、血液の生存保存寿命を延長させることができる。本発明の化合物は、血液 (例えば、SAG-M媒体中) に、 $10 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 、好ましくは $15 \sim 60 \mu\text{mol/L}$ 、例えば $40 \sim 60 \mu\text{mol/L}$ の濃度で添加するのが好適である。本発明の化合物を含む場合に、血液に好適な pH 範囲は、 $\text{pH } 5.5 \sim 6.8$ 、例えば、 $\text{pH } 6.1 \sim 6.5$ である。

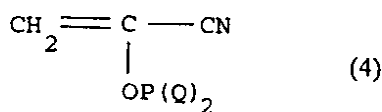
これまでの研究は、本発明の化合物を、化粧品；腫瘍治療における補充薬；肉体的および精神的疲労の治療；抗結石剤または抗カリエス剤；皮膚老化の治療 (例えば、ケラチン新陳代謝を促進することによる)；循環不全の治療；血液または尿中の尿素の測定、ならびにコレステロールおよびトリグリセリドの測定のための診断薬 (本発明の開示の一部に含まれる US-A-99890号)；および、炭水化物、グリコール、アルデヒド、ADP および他のヌクレオチドのような天然産物の酵素ホスホリル化；に使用できることも示唆している。

式1の新規化合物だけでなく、(既知の)式1の除外化合物も、前記使用に有効である。本発明の第二の要旨においては、2-(ジヒドロキシホスホリルオキシ)プロパ-2-エノイックアミド (即ち、PEPの第一級アミドである式3の化合物)、またはホスホエノールピルビン酸 (PEP) (式1； $X=O$ 、 $Y=Z^1=Z^2=OH$) および薬理的に許容されるその塩の製造方法を提供し、



該方法は、

(i) 式4：



[式中、Qはハロ化合物である。]

で示される化合物を加水分解して、式3のアミドを形成し、

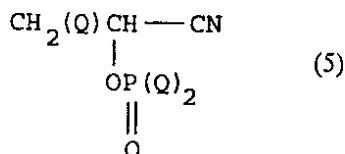
(ii) 該アミドを、例えばデアミナーゼを使用して酵素的に、または、例えば温和アルカリ (例えば、 0.1 N 水酸化ナトリウム) を使用して温和加水分解 (mild hydrolysis) によって、ホスホエノールピルビン酸に随意に変換し、および

(iii) 該アミドまたは該ホスホエノールピルビン酸を、随意にそれらの塩に変換する；

ことを含んで成る方法である。式4のニトリルは重要な中間体であり、活性であってもよい。

式4中のシアノ基を加水分解してアミド基を生成できるということは、特に驚くべきことである。これは、加水分解の初期段階の間に、式4の二ハロゲン化物から形成される並列燐酸基の関与によると考えられる。

式4の化合物は、式5：



の化合物を、塩基で処理することによって製造される。

式5の化合物は、アクリロニトリル ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CN}$) の酸化ハロホスホリル化によって製造される。

酸化ハロホスホリル化は、酸素 (ガス) または酸素供与化合物の存在において PCl_3 を使用して行うのが好ましい。従って、前記式4および5において、Qはクロロであるのが好ましい。塩基は、トリエチルアミンのような第三級アミンであるのが好ましい。

好ましい態様においては、2-(ジヒドロキシホスホリルオキシ)-プロパ-2-エノイックアミドが、三塩化磷および酸素とアクリロニトリルとの反応、それに続く HCl 除去および生成される化合物の加水分解によって製造される。 PCl_3 および酸素と、アクリロニトリルとの反応は、 PCl_3 : アクリロニトリル = 1: 5 ~ 30 の相対比において、
- 30 ~ + 50 の温度範囲で行うのが好ましい。脱ハロゲン化水素は、不活性溶媒 (例えば、エーテル、ベンゼンおよび四塩化炭素) 中で、種々の塩基 (例えば、トリエチルアミンおよびピリジン) を用いて行うことができる。加水分解は、不活性溶媒 (例えば、エーテル、ベンゼン、ヘキサン、塩化メチレンまたはクロロホルム) の存在または不存在において、水によって行うことができる。水のみが使用される場合は、凍結乾燥して、過剰の水を除去し、生成物を単離するのが最も好ましい。

一般に式2で示されるPEPの第二級および第三級アミドは、下記のように製造することができる:

1. 例えば塩化チオニルとの反応によって $\text{CH}_2 = \text{C}[\text{OP}(\text{O})\text{Cl}_2] - \text{C}(\text{O})\text{Cl}$ に変換し、次いで第一級または第二級アミンと反応させる。

2. アクリリルクロリド $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{C}(\text{O})\text{Cl}$ を酸化ホスホリル化し、次いで第三級アミンを用いて脱ハロゲン化水素して、前記(1)のトリクロリドを得、次いで第一級または第二級アミンと反応させる。

本発明の化合物の製剤は、経口投与、非経口投与 (皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与および関節内投与)、直腸投与、および局所投与 (皮膚投与、口内投与 (buccal)、舌下投与および眼内投与) に好適な製剤を包含するが、最も適している経路は、例えば患者の症状および傷害に依存する。製剤は、単位投与形態において供給するのが好都合であり、薬学分野において既知の方法によって製造される。全ての方法が、式1の化合物、および全てのその塩、エステル、アミドおよび生理学的に許容されるプロドラッグ (有効成分) を、1種類またはそれ以上の補助成分を含んで成る担体と合わせる段階を含む。一般に、有効成分と、液体担体または微細分離固形担体あるいはそれらの両方とを、均質および緊密に合わせ、次いで、必要であれば、その製品を所望の製剤に成形することによって、製剤が製造される。

本発明の化合物の一般的な製剤は、心臓手術および移植手術において使用される心臓麻痺液または再灌流液であり、それらの製剤は、本発明の化合物の他に、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよび緩衝剤を含んで成る。特に、心臓麻痺液または再灌流液は、(本発明の化合物の他に) 塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、重炭酸カリウム、および重リン酸カリウムを含んで成る。

赤色血液細胞を回復させるために使用される製剤は、本発明の化合物の他に、1つまたはそれ以上のナトリウムまたはマグネシウム L-アスコルベートホスフェート、マルトース、マンニトールまたはスクロース、アデニン、クエン酸三ナトリウムおよび塩化ナトリウムを含有する (浸透圧を調節するため)。

経口投与に好適な本発明の製剤は、所定量の有効成分をそれぞれ含有するカプセル剤、サシェ剤または錠剤のような個別単位として; 散剤または顆粒剤として; 水性液または非水性液中の溶液または懸濁液として; あるいは、水中油の液体エマルジョンまたは油中水の液体エマルジョンとして; 供給することができる。有効成分が、ボラス (bolus)、舐剤、またはペーストとして存在してもよい。

錠剤は、随意に1種類またはそれ以上の補助成分を使用して、圧縮または成型によって製造される。圧縮錠剤は、結合剤、潤滑剤、不活性稀釈剤、減摩性、界面活性または分散補助剤と随意に混合して、粉末または顆粒のようなさらさらした形態の有効成分を、適切な機械で圧縮することによって製造される。成型錠剤は、不活性稀釈剤で湿らせた粉末化合

10

20

30

40

50

物の混合物を、適切な機械で成型することによって製造される。錠剤は、随意に被覆するかまたは溝をつけ (scored) て、その中の有効成分の遅延されたまたは制御された放出を与えるように製剤化することもできる。

非経口投与のための製剤は、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および意図する患者の血液と製剤とを等張性にする溶質、を含有する水性または非水性滅菌注射液；ならびに、沈殿防止剤および増粘剤を含有する水性および非水性滅菌懸濁剤を包含する。この製剤は、単用量 (unit-dose) 容器または多用量 (multi-dose) 容器、例えば密封アンプルおよびバイアルにおいて供給することができ、および、滅菌液体担体、例えば生理食塩水または注射用の水を、使用のすぐ前に添加するだけでよい凍結乾燥 (freeze-dried) (lyophilized) 状態で保存することができる。即席 (extemporaneous) 注射液および懸濁剤は、前記

10

の種類滅菌散剤、顆粒剤および錠剤から製造される。直腸投与のための製剤は、カカオ脂またはポリエチレングリコールのような通常の担体を使用して、坐薬として供給することができる。

口内投与または舌下投与のような、口中局所投与のため製剤は、スクロースおよびアカシアゴムまたはトラガカントゴムのような風味基剤に有効成分を含んで成るトローチ剤 (lozenges)；ならびに、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアゴムの

ような基剤に有効成分を含んで成るパステル剤 (pastilles) を包含する。本発明の化合物は、成人に関して、5 g ~ 25 g /日、例えば約 15 g /日の投与量範囲において、経口投与または注射による投与を行うことができる。分離単位において供給される錠剤または他の形態は、好都合なことに、そのような用量において有効な所定量の本発

20

明化合物を含有するか、または、複式の用量、例えば、500 mg、1 g または 2 g を含有する単位であってもよい。

本発明の他の要旨は、以下の通りである。虚血が起こった、または起こり得る細胞と、本発明の化合物、特に式 3 の化合物およびその塩とを接触させることを含んで成る、虚血傷害の間のまたは後の、患者の心筋回復を補助する方法。

好ましい態様においては、本発明の化合物が、心臓手術、例えば、冠動脈バイパス手術または弁交換または心臓移植手術 (または他の器官の移植手術) を受けている患者の心臓を停止させ (arrest)、補助する (support) ために使用される心臓麻痺液に含有される。

従って、好ましい方法においては、本発明の心臓麻痺液が、手術の間に心臓を停止し維持するために使用され、次に、心臓が再灌流液で再灌流される。再灌流液も本発明の化合物を含有するのが好ましい。

30

本発明を、下記実施例によって例示する。

実施例 1：2 - (ジヒドロキシホスホリルオキシ) プロパ - 2 - エノイックアミド (エノールピルピニアミド 2 - O - ホスフェート)、式 3 の化合物

段階 1：アクリロニトリルの酸化ハロホスホリル化による、1 - シアノ - 2 - クロロエチル燐酸のジクロリドの合成

反応器にアクリロニトリル (56 g) および三塩化燐 (1050 g) を入れ、発熱反応が終了するまで、激しく攪拌し、冷却して温度を 20 に維持しながら、0.01 m³/時の容量速度で酸素を泡立たせた。三塩化燐を減圧下に蒸留によって除去し、残渣を約 1 mm

40

において真空蒸留し、85 ~ 95 の沸点を有する留分中の無色留出物として生成物を集めた (139.3 g)。収率 71%。
NMR 1H: 3.89 (CH₂C1, JHH 5.0); 5.58 (CH, 3JHP 11.8); NMR 13C: 42.29 (CH₂C1, 3JPC 7.99); 66.42 (CH, 2JPC 7.19); 112.42 (CN, 3JPC 4.63); NMR 31P: 9.11.

段階 2：脱ハロゲン化水素による、1 - シアノエテン燐酸のジクロリドの合成

段階 1 から集めた留出物留分 (distillate fraction) の溶液を、無水エーテル (500 mL) に加え、次いで、無水エーテル (100 mL) 中のトリエチルアミン (26.7 g) を 10 で滴下した。添加終了後、その混合物を 20 分間攪拌し、沈殿物を濾過によ

50

て分離した。溶媒を、水噴射アスピレーターを使用して真空蒸留によって除去し、残渣を真空蒸留(1 mm)して、生成物を無色留出物として得た(34.5 g、沸点40)。収率75%。

NMR 1H: 6.02 (HA, CHAHB =, 4 JAP 3.85, JAB 3.85); 5.94 (HB, CHAHB = 4 JBP 3.85); NMR 13C: 120.92 (CH2 =, 3 JPC 7.34); 125.28 (-C(OP) =, 2 JPC 11.72); 111.23 (CN, 3 JPC 5.58); NMR 31P 2.32.

段階3: 加水分解による、エノールピルピニアミドO-ホスフェートの合成

クロロホルム(50 mL)中の1-シアノエテンリン酸(23.7 g)の攪拌溶液に、水(9.5 g)を30 ~ 35 で滴下した。添加終了後、その反応混合物を20分にかけて40 に温めてHClを除去した。溶媒を真空除去し、アセトニトリル(400 mL)を残渣に加えた。沈殿物を分離し、真空乾燥して、生成物を白色結晶として得た(12.8 g)。収率59%。

1H NMR: 5.84 (HA, CHAHB =, 4 JAP 2.5, JAB 2.5); 5.43 (HB, CHAHB =, 4 JBP 2.5); 13C NMR (solvent CD3OD): 105.7 (CH2 =); 148.01 (-C(OP) =, 2 JPC 8.35); 166.27 (C(O)NH2, 3 JPC 8.7); 31P NMR: -4.86.

実施例2

実施例1を繰り返し、最終生成物を、段階4によってエノールピルピニアミド2-O-ホスフェートのモノカリウム塩として得た。

段階4:

無水エタノール(50 mL)中のエノールピルピニアミドホスフェート(4.4 g)の攪拌溶液に、無水エタノール(30 mL)中の水酸化カリウム(1.48 g)を15 ~ 20 で滴下した。形成された沈殿物を分離し、真空乾燥して、目的化合物を白色結晶として得た(3.45 g)。収率75%。

1H NMR: 5.63 (HA, CHAHB =, 4 JAP 1.96 JAB 1.96); 5.29 (HB, CHAHB =, 4 JBP 1.96); 13C NMR (solvent D2O): 104.97 (CH2 =, 3 JPC 3.07); 147.02 (-C(OP) =, 2 JPC 7.89); 167.89 (C(O)NH2, 3 JPC 7.24); 31P NMR: -4.58.

実施例3

40 の温度を用いて実施例1の段階1を繰り返した。1-シアノ-2-クロロエチルリン酸のジクロリドの収率は65%であった。

実施例4

5:1のPC13:アクリロニトリルの比率を使用して、実施例1の段階1を繰り返した。1-シアノ-2-クロロエチルリン酸のジクロリドの収率は54%であった。

実施例5

エーテルの代わりにベンゼン(50 mL)を使用して、実施例1の段階2を繰り返した。収率は60%であった。

実施例6

エーテルの代わりに四塩化炭素(100 mL)、およびトリエチルアミンの代わりにピリジンを使用して、実施例1の段階2を繰り返した。収率は40%であった。

前記合成は、高収率(3つの段階における全般的収率31%)および高純度(96~99.9%)における、2-(ジヒドロキシホスホリルオキシ)プロパ-2-エノイックアミドおよびいくつかの誘導体の3段階合成を提供する。

例えば、デアミナーゼ酵素を使用して前記アミドをPEPに単に脱アミノ化することによって、または温和加水分解によって、好都合な方法で前記合成を使用してPEPを生成することもできる。さらに、前記第一級アミドのCH₂=C[OP(O)Cl₂]C(O)Clへの変換、それに続く第一級または第二級アミンとの反応によって、第二級および第三

10

20

30

40

50

級アミドを前記経路によって製造することもできる。これは実施例7～9に記載されている。

実施例7

アクリル酸クロリド ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{COCl}$) を、三塩化リンおよび酸素と反応させて、中間体 (1) $\text{ClCH}_2 - \text{CH}(\text{COCl})\text{OP}(\text{O})\text{Cl}_2$ および少量のホスホネート $\text{ClCH}_2 - \text{CH}(\text{COCl})\text{P}(\text{O})\text{Cl}_2$ を得る。次いで、トリエチルアミンで処理して、ホスフェート (1) をエノールホスフェートトリクロリド (2) $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{COCl})\text{OP}(\text{O})\text{Cl}_2$ に変換し、次いで、分別蒸留によって精製する。次に、1当量の種々の第二級および第一級アミン、次いで2当量の水で処理して、アミド (3) $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CONR}^1\text{R}^2)\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ [式中、 $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{Et}$ または Me 、式中、 $\text{R}^1 = \text{C}_6\text{H}_{11}$ 、 $\text{R}^2 = \text{H}$ である。] を得る。

10

実施例8

実施例1の式3の化合物を、3当量の *t*-カリウム *t*-ブトキシドで処理して、トリカリウム塩を得、次いで、1当量のヨウ化メチルを加えて、式3の化合物の *N*-メチル類似体、即ち、 $\text{CH}_2 = \text{CH}(\text{CONHMe})\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ を得る。

実施例9

ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) および *N*-ヒドロキシスクシンイミドの存在において、ビルビン酸とジエチルアミンとを縮合させて、 $\text{CH}_3\text{COCONEt}_2$ を生成する。次いで、下記合成経路によって、PEPのジエチルアミドに変換する： $\text{CH}_3\text{COCONEt}_2 \rightarrow \text{LiCH}_2\text{COCONEt}_2 \rightarrow \text{ClP}(\text{O})(\text{OEt})_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{C} = \text{C}(\text{CONEt}_2)\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})_2 \rightarrow \text{ClSiMe}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{C} = \text{C}(\text{CONEt}_2)\text{OP}(\text{O})(\text{OSiMe}_3)_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_2\text{C} = \text{C}(\text{CONEt}_2)\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ 。

20

実施例10

過剰のトリエチルアミン中でトリクロリド (1) を過剰の乾燥メタノールで処理することによって、ホスフェートトリクロリド (1) $\text{ClCH}_2 - \text{C}(\text{COCl})\text{OP}(\text{O})\text{Cl}_2$ を、トリエステル $\text{CH}_1 = \text{C}(\text{COOMe})\text{OP}(\text{O})(\text{OMe})_2$ に変換することができる。次いで、そのトリエステルを、シリルエステル $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CO}_2\text{Me})\text{OP}(\text{O})(\text{OSiR}_3)_2$ を経て、モノカルボン酸エステル $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CO}_2\text{Me})\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ に変換することができる。

30

実施例11：血液貯蔵 (storage) / 保存 (preservation)

式3の化合物を使用して、長期間にわたって血液を十分に保存することができた。実験計画は以下の通りであった。3単位の静脈血を、3人のドナーから採取し、(a) 生理食塩水 - アデニン - グルコース - マンニトール (SAGM) - 対照、(b) SAGM + $1.25 \mu\text{mol}^{-1}$ の化合物3、(c) $1.25 \mu\text{mol}^{-1}$ の化合物3、で処理した。次に、これらを4日間で保存した。無菌アリコートを、0、1、4、7、14、21、28、35、42および49日めに抜き取り、2、3DPG電解質、FBC、ラクテート、メトヘモグロビン、酸素解離、赤色血液細胞 (RBC) ATPアッセイ、RBC形態、および血液培養に関して評価した。

ヘモグロビン変異体を0日めに評価し、血液培養物を7日めおよび49日めに評価した。

40

実施例12

実施例8に使用される灌流/再灌流液および心臓麻痺液 (本発明による) を下記のように構成した。

Krebs Henseleit (KH) 緩衝剤-再灌流液

化合物	gm/5L	ミリモル/L
NaCl	34.63	118.5
NaHCO ₃	10.50	25.0
KCl	1.75	4.75
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.48	1.19
KH ₂ PO ₄	0.80	1.18
グルコース	10.0	11.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.04	1.4

前記化合物を5リットル容量フラスコに入れ、次に、約5Lの脱イオン水を加え、次いで、95%O₂/5%CO₂を含有するガスをその溶液中に約10~15分間にわたって泡立たせる。これによって、pHが7.4に低下し、カルシウムを添加する際の燐酸カルシウムの沈殿が防止される。

泡立たせた後、気体CaCl₂ · 2H₂Oを添加して、容量を5Lにし、その溶液を5μmフィルターで濾過する。随意に、本発明の化合物、好ましくは実施例1の化合物(式3)を、その再灌流液に加える。

心臓麻痺液No.2(STH2)(St.Thomas病院で使用)

実施例1のPEP-アミドを導入
原液(1L)

化合物	gm/1L	ミリモル/L
NaCl	32.142	550.0
MgCl ₂ · 6H ₂ O	16.25 (32 ml/L)	80.0**
KCl	5.95	80.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.88	60.0
NaHCO ₃	4.2	50.0
PEP-アミド (実施例1より)		0.1 (100 μmol/L)

** MgCl₂ · 6H₂Oに関しては、500gmを溶解することによって原液を製造した(即ち、新たなジャーのMgCl₂ · 6H₂Oを1Lの脱イオン水に導入。)

1Lの心臓麻痺液を、各200mLの前記原液を添加することによって製造した。これによって、各化合物の最終濃度が得られる。

化合物	gm/5L	ミリモル/L
NaCl	200.0	110.0
MgCl ₂ · 6H ₂ O	200.0	16.0
KCl	200.0	16.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200.0	1.2
NaHCO ₃	200.0	10.0

実施例1の化合物(式3)

0.1 (100 μmol/L) 10

次に、pHを3.7において7.8に調節し(ホートプレート攪拌器で加熱することによって)、次に、その溶液を5 μmフィルターで濾過した。

実施例13: 心臓機能の回復

実施例12の心臓麻痺液を、ラット心臓機能の虚血後回復において、PEPのモノカリウム塩(PEP-K)の心臓麻痺液と比較した(下記に詳細に記載する)。

単離された機能している(working)ラット心臓の試料を使用した。これは、測定される心臓機能の表示(大動脈流量、冠動脈流量、心拍数、大動脈収縮期圧力および拡張期圧力)、ならびに派生する追加的表示(心拍出量、心拍血液量、鼓動(stroke work))が可能である。この試料を使用して、心肺バイパスを刺激し、心臓麻痺停止および虚血後の支持バイパスを導入することが可能である。この心臓を、実施例12で製造される95% O₂ / 5% CO₂を含有するKrebs Henseleit緩衝液(KHB)で灌流した。初めに、心臓をLangendorffモードで5分間平衡で灌流し、次に、機能モード(working mode)に10分間切り替え、好気対照機能(aerobic control function)の測定を行った。次に、心臓をLangendorffモードにさらに5分間再切り替えし、通常のKHB、または式3の化合物(実施例1)を添加されたKHBのいずれかで灌流し;次に、第2期の対照機能の測定のために、その心臓を機能モードに再切り替えした(ここでも再び、対照KHB、またはKHB + PEP-アミド)。次に、心臓を実施例12で製造される心臓麻痺液で停止させ、30分間の正常温度全体的虚血にかけ、次に、Langendorffモードにおいて15分間で対照KHBまたは式3の化合物を含有するKHBのいずれかで再灌流した。次に、心臓を、再灌流機能モードに切り替え(KHBまたはKHB + 式3の化合物で再灌流)、虚血後機能を測定し、虚血前対照機能の%で表した。最後に、心臓を再びLangendorffモードに5分間切り替え、次に、再び機能モードにさらに15分間戻し、虚血後機能を再び測定した。この最後の期間においては、心臓をKHBのみで再灌流した。

3つのグループに関して試験した:

1. 心臓を、KHBまたは通常的心臓麻痺液で灌流した。
2. 100 μmol/Lの式3の化合物を、前処置としてKHBに添加し、心臓麻痺液に添加し、ならびに、初期Langendorffの間、および機能モード再灌流の間に添加した。
3. 100 μmol/Lの式3の化合物を、前処置としてKHBに添加し、心臓麻痺液に添加し、ならびに、初期Langendorffの間、および機能モード再灌流の間に添加した。

機能の回復

対照心臓においては、大動脈流量の回復が23.5% ± 3.5%であり、式3の化合物は回復を69.3 ± 4.3%に向上させた。3つのグループについてそれぞれ測定された心臓特性が図面に示されており、図1~8はそれぞれ、大動脈流量、冠動脈流量、心拍出量、心拍数、収縮期圧力、拡張期圧力、心拍血液量、および拍動(stroke work)を示す。図9および10はそれぞれ、再灌流の時間に対する、10分および20分における大動脈流量の回復を示す。

従って、式3の化合物は、前処置として、および/または心臓麻痺液への添加剤として、および/または再灌流液への添加剤として使用した場合に、100 μmol/Lの用量での使用において、虚血後機能回復を顕著に増加させた。さらに、式3の化合物は、PEP-Kと比較して、虚血後機能回復を顕著に増加させた(約25%で増加)。

40

90

実施例 14 : 機能の回復

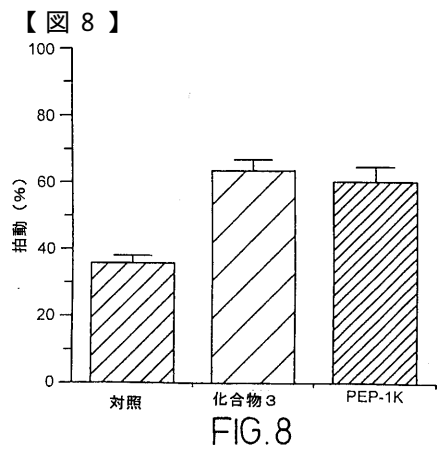
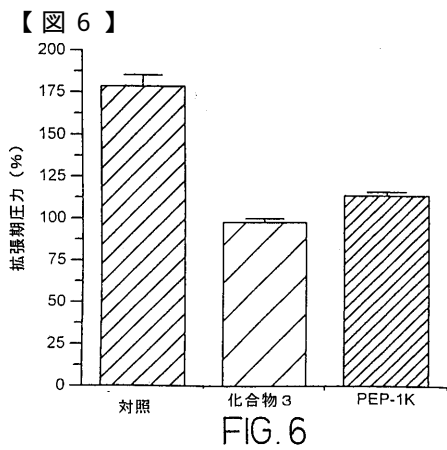
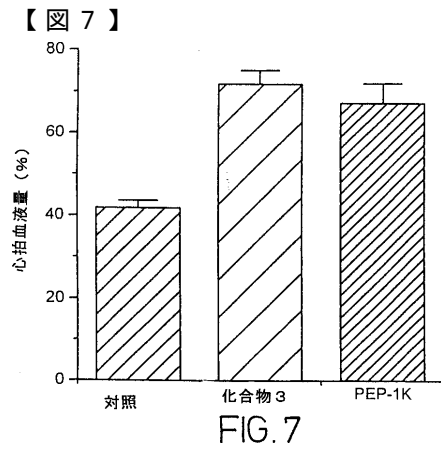
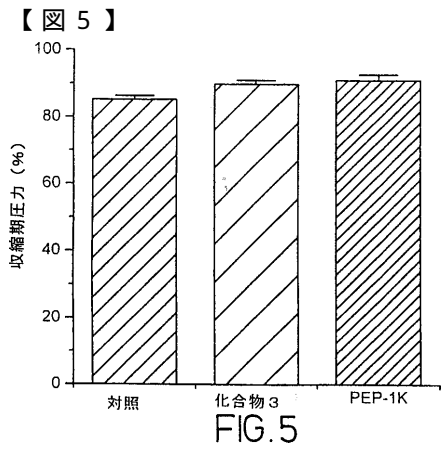
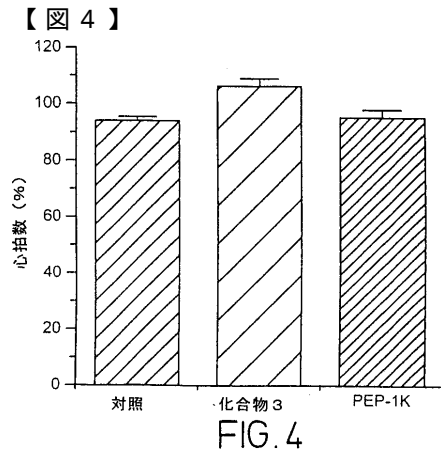
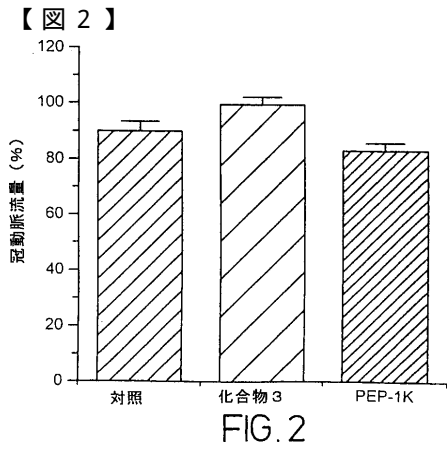
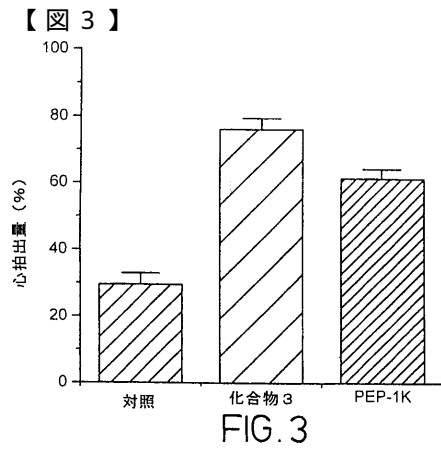
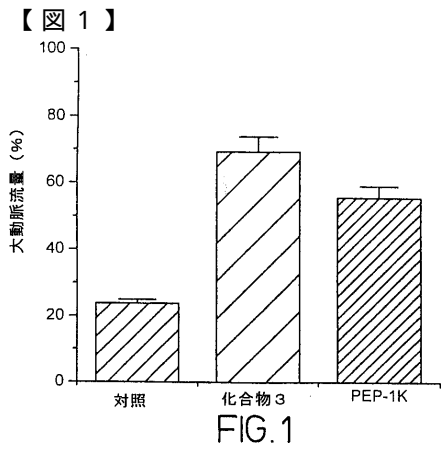
式 3 の化合物 (化合物 3) およびそのモノカリウム塩 (K - 化合物 3) を、下記の心臓麻痺液と比較して試験した : Langendorff 灌流液 (対照)、ホスホクレアチン (P C r) - 標準 / 商業的に可能な処置、および P E P のモノカリウム塩 (P E P - K)。機能再灌流の間の回復輪郭が、図 1 1 に示されている。特に図 1 1 は、対照心臓、または、100 $\mu\text{mol/L}$ の化合物 3、P E P - K、K - 化合物 3、または 10 $\mu\text{mol/L}$ のホスホクレアチン (P C r)、で処置した心臓における大動脈流量の回復輪郭を示す。Langendorff (L) 灌流液は、淡色バー (light shaded bars) で示されている。結果を、100% に標準化された第 2 機能期間の平均 % で示す。数値は平均値である (S E M は簡便のために省略した)。図 1 2 は、対照心臓、および 100 $\mu\text{mol/L}$ の化合物 3、P E P - K、K - 化合物 3、10 $\mu\text{mol/L}$ のホスホクレアチン (P C r) で処置した心臓の、50 分間再灌流後の % 回復を示す。数値は、平均値 \pm S E M である ; * $p < 0.05$ 。

対照心臓、ならびに化合物 3 および K - 化合物 3 で処置したグループの心臓は、急速に回復し、初期再灌流時間から 10 分で安定水準に達する (このとき、どの薬剤処置グループにおいても薬剤がなお存在すると考えられ、これは薬剤が心臓の回復速度を阻害しなかったことを意味している)。これらの心臓のグループは、第 2 機能再灌流期間に、再灌流液が K H 緩衝液のみに置き換えられたときに、向上も低下も示さなかった (薬剤が回復の程度を阻害しないことを示唆している)。この速い速度の回復は、心臓または脳のような非常に重要な組織を救うのに極めて重要である。これと対照的に、10 $\mu\text{mol/L}$ の P C r で処置した心臓はゆっくり回復し、15 分間の初期機能再灌流時間にわたって継続的に回復した。これらの心臓は、K H のみで再灌流した際に回復を継続し、この回復は最後の 10 分間の再灌流まで安定水準に達しなかった。臨床状況において、化合物 3 および K - 化合物 3 の最適な投与計画は、再灌流および虚血の間の投与を必要とする。図 1 2 は、全てのグループの最終回復 (50 分間の合計再灌流時間の終わりにおける回復) を示している。化合物 3 で処置した心臓の回復が、対照心臓より顕著に優れており ($p < 0.05$)、他の薬剤で処置したグループよりも優れていたことが明らかである。K - 化合物 3 は、化合物 3 ほど優れていないが、それでもなお対照グループより高レベルの回復を補助した。この試験は、虚血前灌流液、心臓麻痺液、および初期再灌流液の添加剤として (および 100 $\mu\text{mol/L}$ の用量において)、化合物 3 および K - 化合物 3 が、正常温度全体虚血を受けるラット心臓において、虚結後機能回復を顕著に向上させることを確認するものである。さらに、化合物 3 で処置された心臓は、P E P またはホスホクレアチンで処置された心臓より優れた回復を示す傾向があることを示している。これは低体温条件下でも同様である。さらに、化合物 3 および K - 化合物 3 は両方とも、投与後の最初の 10 分間において、ホスホクレアチンより速い速度の心臓回復を補助し、これは、心臓および脳のような重要な組織の機能の回復を補助することにおいて極めて重要なことである。

10

20

30



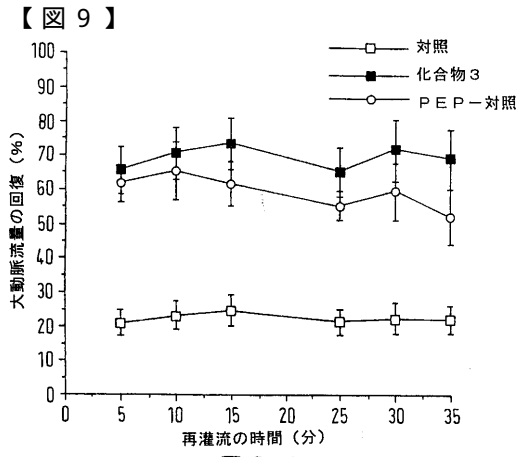


FIG.9

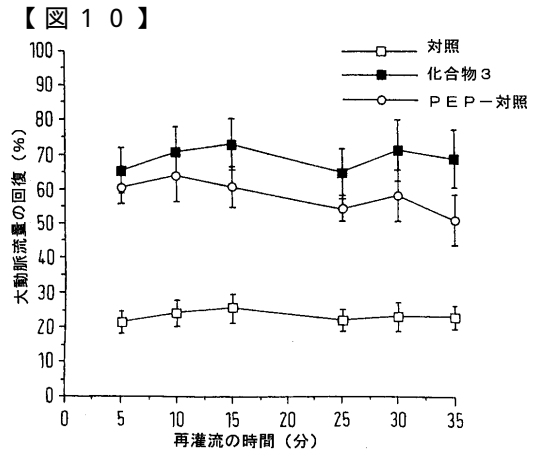


FIG.10

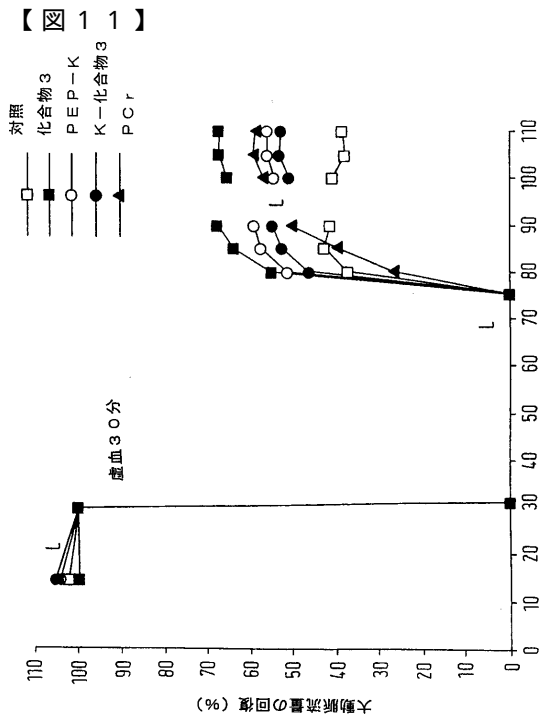


FIG.11

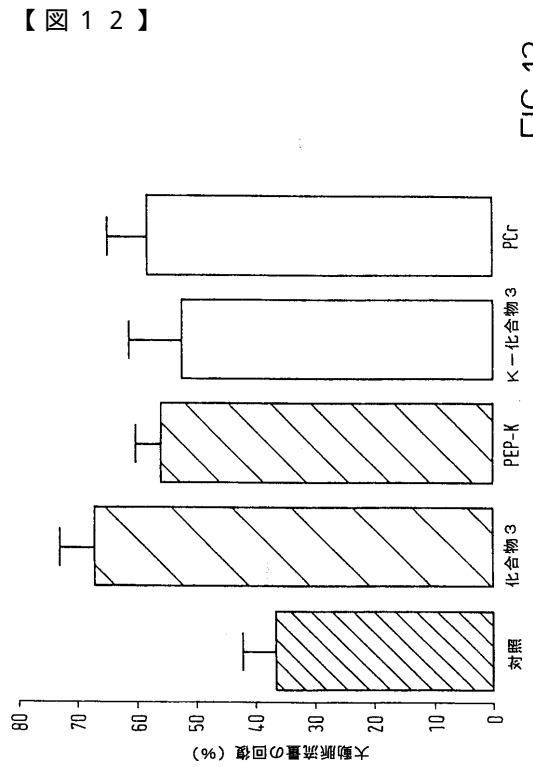


FIG.12

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(72)発明者 ゴーレビッチ、イゴル・エウゲニェビッチ
ロシア国、194355 セント・ペテルスブルク、ウル・コンポジトロフ、9番、アパートメン
ト144号

(72)発明者 イオニネ、ボリス・イオシフォビッチ
ロシア国、199406 セント・ペテルスブルク、ウル・ガバンスカヤ、48番、アパートメン
ト83号

審査官 藤森 知郎

(56)参考文献 特開昭48-098039(JP,A)
特開昭62-221628(JP,A)
特開昭62-270592(JP,A)
特開昭63-045288(JP,A)
Biochemistry, 1972年, 11(3), p.338-p.345

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07F 9/113
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)