

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5974180号
(P5974180)

(45) 発行日 平成28年8月23日 (2016. 8. 23)

(24) 登録日 平成28年7月22日 (2016. 7. 22)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/4439 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4439 Z N A

A 6 1 K 31/506 (2006. 01)

A 6 1 K 31/506

A 6 1 P 13/12 (2006. 01)

A 6 1 P 13/12

請求項の数 4 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2015-529664 (P2015-529664)
 (86) (22) 出願日 平成25年8月2日 (2013. 8. 2)
 (65) 公表番号 特表2015-531774 (P2015-531774A)
 (43) 公表日 平成27年11月5日 (2015. 11. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/006985
 (87) 国際公開番号 W02014/035070
 (87) 国際公開日 平成26年3月6日 (2014. 3. 6)
 審査請求日 平成27年4月24日 (2015. 4. 24)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0093936
 (32) 優先日 平成24年8月27日 (2012. 8. 27)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 515054871
 エウハ ユニヴァーシティ・インダストリ
 ー コラボレーション ファウンデーション
 大韓民国、ソウル 120-750 ソデ
 ムンング、エウハイエオデーギル、52
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピラゾール誘導体を含む腎臓疾患の予防または治療用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記列挙された化合物の中から選ばれた化合物またはこれらの薬学的に許容される塩を含む、腎臓疾患の予防または治療用組成物であって、前記腎臓疾患が、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、糸球体腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、ループス腎炎、多嚢性腎臓疾患および腎不全よりなる群から選ばれる少なくとも一つの腎臓疾患である、予防または治療用組成物：

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl)；

3 - (3 - メトキシフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン；

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート；

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

10

20

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - (2 - (ベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) フェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - (ピフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ; および

3 - { 2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニル) ビニル } - 4 - プロピル - 1 - (2 - ピリジニル) ピラゾール - 5 - オール。

【請求項 2】

下記列挙された化合物の中から選ばれた化合物またはこれらの薬学的に許容される塩を含む、腎臓疾患の予防または治療用組成物であって、前記腎臓疾患が、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、糸球体腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、ループス腎炎、多嚢性腎臓疾患および腎不全よりなる群から選ばれる少なくとも一つの腎臓疾患である、予防または治療用組成物：

10

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl) ;

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート ;

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

20

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ; および

3 - (ピフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール。

【請求項 3】

腎臓疾患の予防または治療用薬学的製剤を製造するための下記に列挙された化合物またはこれらの薬学的に許容される塩の用途であって、前記腎臓疾患が、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、糸球体腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、ループス腎炎、多嚢性腎臓疾患および腎不全よりなる群から選ばれる少なくとも一つの腎臓疾患である、用途：

30

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl) ;

3 - (3 - メトキシフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン ;

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート ;

40

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - (2 - (ベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) フェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - (ピフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ; および

3 - { 2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニル) ビニル } - 4 - プロピル - 1 -

50

(2 - ピリジニル) ピラゾール - 5 - オール。

【請求項 4】

腎臓疾患の予防または治療用薬学的製剤を製造するための下記に列挙された化合物またはこれらの薬学的に許容される塩の用途であって、前記腎臓疾患が、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、糸球体腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、ループス腎炎、多嚢性腎臓疾患および腎不全よりなる群から選ばれる少なくとも一つの腎臓疾患である、用途：

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl) ；

3 - (4 - ブロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート ；

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ；

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ；および

3 - (ビフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ピラゾール誘導体を含む腎臓疾患の予防または治療用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

慢性腎疾患 (chronic kidney disease: CKD) は、心血管疾患の発症率および死亡率が年齢対照群よりも 10 倍以上高い深刻な疾患であって、最近、この疾患に苦しむ患者が幾何級数的に増加している (Schieppati A, Remuzzi G: Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications. *Kidney Int Suppl.* 98:S7-S10, 2005(1))。

【0003】

慢性腎疾患は、上皮から間葉への変化 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) と細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) 蛋白の蓄積を特徴とし、その代表的な病理学的所見としては、糸球体毛細血管基底膜の肥厚、糸球体メサンギウムの拡張、尿細管間質の線維化、糸球体肥大、腎肥大、およびタンパク尿などがある。腎臓組織の線維化に関連する因子であるトランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor- 1: TGF- 1) は、様々な刺激による細胞外マトリックス蛋白生産の最終的なメディエーターであり、線維化の指標として認識されている (Qian Y, Feldman E, Pennathur S, Kretzler M, Brosius FC 3rd: From fibrosis to sclerosis: mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 57: 1439-45, 2008)。

【0004】

一方、慢性腎疾患の一つである糖尿病性腎症 (diabetic kidney disease: DKD) は、末期腎不全 (end-stage renal disease: ESRD) 誘発の最も一般的な原因である (U. S. Renal Data System, USRDS 2011 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2011)。

【0005】

糖尿病性腎症を始めとする慢性腎疾患が末期腎不全に進行するのを抑制するために現在までに知られている治療方法は、徹底した血圧調節や、レニン - アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system: RAS) 遮断剤の使用であるが、依然として完璧な腎保護効果を有する治療剤の開発が切実に求められている (Zhang MZ, Wang S, Yang S, Yang H, Fan X, Takahashi T, Harris RC: The Role of Blood Pressure and the Renin-Angiotensin

10

20

30

40

50

System in Development of Diabetic Nephropathy (DN) in eNOS-/- db/db Mice. Am J Physiol Renal Physiol. Epub ahead of print, 2011)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明者らは、特定のピラゾール誘導体がタンパク尿、糸球体メサンギウムの拡張および腎線維症に対して抑制効果を示すことを見出し、これらが腎臓疾患の予防または治療に使用できることを確認することにより、本発明を完成した。

【0007】

本発明の目的は、ピラゾール誘導体を含む腎臓疾患の予防または治療用組成物を提供することにある。

10

また、本発明の他の目的は、本発明のピラゾール誘導体を投与して腎臓疾患を予防または治療する方法、および腎臓疾患の予防または治療のための薬学的製剤を製造するためのピラゾール誘導体の用途を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、下記列挙された化合物の中から選ばれた化合物またはこれらの薬学的に許容される塩を含む、腎臓疾患の予防または治療用組成物を提供する：

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

20

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl)；

3 - (3 - メトキシフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン；

3 - (4 - ブロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

3 - (4 - ブロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート；

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

30

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ)メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

3 - (2 - (ベンゾ[d][1,3]ジオキサール - 5 - イル)フェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

3 - (ピフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；および

3 - {2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニル)ビニル} - 4 - プロピル - 1 - (2 - ピリジニル)ピラゾール - 5 - オール。

【0009】

40

本発明は、下記列挙された化合物の中から選ばれた化合物またはこれらの薬学的に許容される塩を含む、腎臓疾患の予防または治療用組成物を提供する：

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl)；

3 - (4 - ブロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート；

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ)メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H

50

- ピラゾール - 5 - オール ; および

3 - (ピフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール。

【 0 0 1 0 】

本発明において、薬学的に許容される塩は、医薬業界で通常使用される塩を意味し、例えば、塩酸、硝酸、リン酸、臭素酸、ヨウ素酸、過塩素酸、スズ酸および硫酸などで製造された無機酸塩 ; 酢酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、マレイン酸、コハク酸、シュウ酸、安息香酸、酒石酸、フマル酸、マンデル酸、プロピオン酸、クエン酸、乳酸、グリコール酸、グルコン酸、ガラクトロン酸、グルタミン酸、グルタル酸、グルクロン酸、アスパラギン酸、アスコルビン酸、カルボン酸、バニリン酸、ヨウ化水素酸などで製造された有機酸塩 ; 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、p - トルエンスルホン酸およびナフタレンスルホン酸などで製造されたスルホン酸塩などであってもよいが、これらに限定されない。好ましくは、前記薬学的に許容される塩は塩酸塩である。

10

【 0 0 1 1 】

本発明において、腎臓疾患には、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、糸球体腎炎、腎盂腎炎、間質性腎炎、ループス腎炎、多嚢性腎臓疾患または腎不全が含まれ得る。

前記腎臓疾患は、タンパク尿、糸球体硬化、腎間質性線維化などを特徴とし得る。

【 0 0 1 2 】

本発明の組成物は、本発明の効果を損なわない範囲で薬学的に許容される希釈剤、結合剤、崩壊剤、潤滑剤、pH調整剤、酸化防止剤、溶解補助剤などの薬学的に許容される添加剤を含むことができる。

20

【 0 0 1 3 】

希釈剤としては、糖類、澱粉、微結晶セルロース、乳糖（乳糖水和物）、グルコース、D - マンニトール、アルギン酸塩、アルカリ土類金属塩、クレイ、ポリエチレングリコール、無水リン酸水素カルシウム、またはこれらの混合物などを使用することができ、結合剤としては、澱粉、微結晶セルロース、高分散性シリカ、マンニトール、D - マンニトール、ショ糖、乳糖水和物、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン（ポビドン）、ポリビニルピロリドン共重合体（コポビドン）、ヒプロメロース、ヒドロキシプロピルセルロース、天然ガム、合成ガム、コポビドン、ゼラチン、またはこれらの混合物などを使用することができる。

30

【 0 0 1 4 】

崩壊剤としては、澱粉グリコール酸ナトリウム、トウモロコシ澱粉、ジャガイモ澱粉または前糊化澱粉などの澱粉または変性澱粉 ; ベントナイト、モンモリロナイトまたはビーガム (veegum) などのクレイ ; 微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースなどのセルロース類 ; アルギン酸ナトリウムなどのアルギン酸またはその塩 ; クロスカルメロース (croscarmellose) ナトリウムなどの架橋セルロース類 ; グアーガム、キサントガムなどのガム類 ; 架橋ポリビニルピロリドン (クロスポビドン (crospovidone)) などの架橋重合体 ; 重炭酸ナトリウム、クエン酸などの発泡剤、またはこれらの混合物を使用することができる。

【 0 0 1 5 】

潤滑剤としては、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、水素化植物油、安息香酸ナトリウム、ナトリウムステアリルフマレート、グリセリルベヘネート、グリセリルモノオレエート、グリセリルモノステアレート、グリセリルパルミトステアレート、コロイド状二酸化ケイ素、またはこれらの混合物などを使用することができる。

40

【 0 0 1 6 】

pH調整剤としては、酢酸、アジピン酸、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、ナトリウムエーテレート、リンゴ酸、コハク酸、酒石酸、フマル酸、クエン酸などの酸性化剤と、沈降炭酸カルシウム、アンモニア水、メグルミン、炭酸ナトリウム、酸化マグネシウム、炭酸マグネシウム、クエン酸ナトリウム、第三リン酸カルシウムなどの塩基性

50

化剤などを使用することができる。

【 0 0 1 7 】

酸化防止剤としては、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチル化ヒドロキシアニソール、酢酸トコフェロール、トコフェロール、没食子酸プロピル、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウムなどを使用することができる。本発明の短時間作用型剤において、溶解補助剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリソルベートなどのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ドキュセートナトリウム、ポロキサマー(poloxamer)などを使用することができる。

【 0 0 1 8 】

また、遅延放出性製剤を調製するために、本発明の組成物は、腸溶性ポリマー、水不溶性ポリマー、疎水性化合物、および親水性ポリマーを含むことができる。

【 0 0 1 9 】

前記腸溶性ポリマーとは、pH 5 未満の酸性条件下で不溶性であるか或いは安定であって、pH 5 以上の特定の pH 条件下で溶解または分解されるポリマーをいい、例えば、腸溶性ポリマーとしては、ヒプロメロースアセテートサクシネート、ヒプロメロースフタレート(ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート)、ヒドロキシメチルエチルセルロースフタレート、セルロースアセテートフタレート、セルロースアセテートサクシネート、セルロースアセテートマレート、セルロースベンゾアートフタレート、セルロースプロピオネートフタレート、メチルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロースフタレートおよびメチルヒドロキシエチルセルロースなどの腸溶性セルロース誘導体；スチレン-アクリル酸共重合体、アクリル酸メチル-アクリル酸共重合体、アクリル酸メチルメタクリル酸共重合体(例えば、アクリル-EZE)、アクリル酸ブチル-スチレン-アクリル酸共重合体、およびアクリル酸メチル-メタクリル酸-アクリル酸オクチル共重合体などの腸溶性アクリル酸共重合体；ポリ(メタクリル酸/メタクリル酸メチル)共重合体(例えば、オイドラギットL、オイドラギットS、エボニック社製、ドイツ)、ポリ(メタクリル酸/アクリル酸エチル)共重合体(例えば、オイドラギットL 100-55)などの腸溶性ポリメタクリレート共重合体；酢酸ビニル-マレイン酸無水物共重合体、スチレン-マレイン酸無水物共重合体、スチレン-マレイン酸モノエステル共重合体、ビニルメチルエーテル-マレイン酸無水物共重合体、エチレン-マレイン酸無水物共重合体、ビニルブチルエーテル-マレイン酸無水物共重合体、アクリロニトリル-アクリル酸メチル-マレイン酸無水物共重合体、およびアクリル酸ブチル-スチレン-マレイン酸無水物共重合体などの腸溶性マレイン酸共重合体；ならびに、ポリビニルアルコールフタレート、ポリビニルアセタールフタレート、ポリビニルブチレートフタレートおよびポリビニルアセトアセタールフタレートなどの腸溶性ポリビニル誘導体が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

前記水不溶性ポリマーとは、薬物の放出を制御する水不溶性ポリマーで、薬学的に許容されるものをいう。たとえば、水不溶性ポリマーとしては、ポリビニルアセテート(例えば、コリコートSR30D)、水不溶性ポリメタクリレート共重合体[例えば、ポリ(アクリル酸エチル-アクリル酸メチル)共重合体(例えば、オイドラギットNE30D)、ポリ(アクリル酸エチル-メタクリル酸メチル-トリメチルアミノエチルメタクリレート)共重合体(例えば、オイドラギットRSP0)など]、エチルセルロース、セルロースエステル、セルロースエーテル、セルロースアシレート、セルロースジアシレート、セルローストリアシレート、セルロースアセテート、セルロースジアセテート、およびセルローストリアセテートなどがある。

【 0 0 2 1 】

前記疎水性化合物とは、薬物の放出を制御する水不溶性物質で、薬学的に許容されるものをいう。たとえば、疎水性化合物としては、グリセリルパルミトステアレート、グリセリルステアレート、グリセリルベヘネート、セチルパルミテート、グリセリルモノオレエートおよびステアリン酸などの脂肪酸および脂肪酸エステル類；セトステアリルアルコー

10

20

30

40

50

ル、セチルアルコールおよびステアリルアルコールなどの脂肪酸アルコール類；カルナウバワックス、蜜蝋およびマイクロクリスタリンワックスなどのワックス類；タルク、沈降炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、酸化亜鉛、酸化チタン、カオリン、ベントナイト、モンモリロナイトおよびビーガムなどの無機物質などが挙げられる。

【0022】

前記親水性ポリマーとは、薬物の放出を制御する水溶性ポリマーで、薬学的に許容されるものをいう。たとえば、親水性ポリマーとしては、デキストリン、ポリデキストリン、デキストラン、ペクチンおよびペクチン誘導体、アルギン酸塩、ポリガラクトロン酸、キシラン、アラビノキシラン、アラビノガラクトン、澱粉、ヒドロキシプロピルスターチ、アミロースならびにアミロペクチンなどの糖類；ヒプロメロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース誘導体；グアーガム、ローカストビーンガム、トラガカント、カラギーナン、アカシアガム、アラビアガム、ジェランガムおよびキサンタンガムなどのガム類；ゼラチン、カゼインおよびゼインなどの蛋白質；ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびポリビニルアセタールジエチルアミノアセテートなどのポリビニル誘導体；ポリ（ブチルメタクリレート - （2 - ジメチルアミノエチル）メタクリレート - メチルメタクリレート）共重合体（例えば、オイドラギット E 100、エボニック社製、ドイツ）、ポリ（エチルアクリレート - メチルメタクリレート - トリエチルアミノエチル - メタクリレートクロリド）共重合体（例えば、オイドラギット RL、RS、エボニック社製、ドイツ）などの親水性ポリメタクリレート共重合体；ポリエチレングリコール、およびポリエチレンオキシドなどのポリエチレン誘導体；カルボマーなどが挙げられる。

【0023】

この他にも、着色剤および香料から選ばれた様々な添加剤として、薬学的に許容される添加剤を使用して本発明の組成物を製剤化することができる。

本発明において用い得る添加剤の範囲は上記の添加剤に限定されるものではなく、当業者が前記添加剤を適宜選択し、通常の範囲の用量で用いることにより製剤化することができる。

【0024】

本発明に係る薬学的組成物は、通常の方法によって、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルション、シロップ、およびエアロゾルなどの経口型剤形、外用剤、坐剤または滅菌注射溶液の形態に剤形化して使用することができる。

【0025】

また、本発明は、下記列挙された化合物の中から選ばれた化合物、またはこれらの薬学的に許容される塩を含む、本発明の腎臓疾患の予防または治療用組成物を、哺乳類を含む対象に投与し、腎臓疾患を予防または治療する方法を提供する：

1 - （ピリジン - 2 - イル） - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

1 - （ピリジン - 2 - イル） - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩（1 - （ピリジン - 2 - イル） - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl）；

3 - （3 - メトキシフェニル） - 1 - （ピリジン - 2 - イル） - 1 H - ピラゾール - 5 - （4 H） - オン；

3 - （4 - ブロモフェニル） - 1 - （ピリジン - 2 - イル） - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

3 - （4 - ブロモフェニル） - 1 - （ピリジン - 2 - イル） - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート；

3 - （3 - ヨードフェニル） - 1 - （ピリジン - 2 - イル） - 1 H - ピラゾール - 5 - オール；

3 - （（ナフタレン - 3 - イルオキシ）メチル） - 1 - （ピリジン - 2 - イル） - 1 H

10

20

30

40

50

- ピラゾール - 5 - オール ;
 3 - (2 - (ベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) フェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;
 3 - (ビフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ; および
 3 - { 2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニル) ビニル } - 4 - プロピル - 1 - (2 - ピリジニル) ピラゾール - 5 - オール。

【 0 0 2 6 】

本発明において、用語「投与」は、ある適切な方法で患者に本発明の腎臓疾患予防または治療用組成物を導入することを意味し、本発明の腎臓疾患予防または治療用組成物の投与経路は、目的組織に到達することができる限り、いかなる一般的な経路を通じても投与することができる。例えば、経口投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、内皮投与、鼻内投与、肺内投与、直腸内投与、腔内投与、腹腔内投与、硬膜内投与を採用することができるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 7 】

本発明に係る腎臓疾患予防または治療用組成物は、1日1回または一定の時間間隔を置いて1日2回以上投与することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明において、下記列挙された化合物の中から選ばれた化合物またはこれらの薬学的に許容される塩の投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、排泄率および疾患の重症度などに応じて、その範囲が多様である：

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;
 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール · HCl) ;
 3 - (3 - メトキシフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン ;
 3 - (4 - ブロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;
 3 - (4 - ブロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート ;
 3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;
 3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;
 3 - (2 - (ベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) フェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;
 3 - (ビフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ; および
 3 - { 2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニル) ビニル } - 4 - プロピル - 1 - (2 - ピリジニル) ピラゾール - 5 - オール。

例えば、投与量は 0 . 1 ~ 1 0 0 m g / k g / d a y であり、これは患者の重症度、年齢、性別などに応じて変化させることができる。

【 0 0 2 9 】

また、本発明は、下記列挙された化合物の中から選ばれた化合物またはこれらの薬学的に許容される塩を含む、本発明の腎臓疾患の予防または治療用組成物を、哺乳類を含む対象に投与し、腎臓疾患を予防または治療する方法を提供する：

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピ

10

20

30

40

50

ラゾール - 5 - オール・HCl) ;

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート ;

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ; および

3 - (ビフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール。

【 0 0 3 0 】

10

また、本発明は、腎臓疾患の予防または治療用薬学的製剤を製造するための下記に列挙された化合物またはこれらの薬学的に許容される塩の用途を提供する :

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl) ;

3 - (3 - メトキシフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - (4 H) - オン ;

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

20

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート ;

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - (2 - (ベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) フェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - (ビフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ; および

30

3 - { 2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニル) ビニル } - 4 - プロピル - 1 - (2 - ピリジニル) ピラゾール - 5 - オール。

【 0 0 3 1 】

また、本発明は、腎臓疾患の予防または治療用薬学的製剤を製造するための下記に列挙された化合物またはこれらの薬学的に許容される塩の用途を提供する :

1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オールの塩酸塩 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・HCl) ;

3 - (4 - プロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - イルアセテート ;

40

3 - (3 - ヨードフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ;

3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール ; および

3 - (ビフェニル - 4 - イル) - 1 - (ピリミジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール。

【 発明の効果 】

【 0 0 3 2 】

本発明の化合物またはこれらの薬学的に許容される塩は、タンパク尿、糸球体肥大およ

50

び腎線維症に対する抑制効果があり、腎臓疾患の予防または治療に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1A】実施例1の化合物が、糸球体の肥大および糸球体メサンギウムの拡張に及ぼす影響を示す図である。

【図1B】実施例1の化合物が、糸球体の肥大および糸球体メサンギウムの拡張に及ぼす影響を示す図である。

【図1C】実施例1の化合物が、糸球体の肥大および糸球体メサンギウムの拡張に及ぼす影響を示す図である。

【図2】実施例1の化合物が、コラーゲン蓄積{マッソントリクローム(Masson's trichrome)染色)、ピクロシリウスレッド(picrosirius red)染色}とマクロファージマーカー(F4/80)の生成に及ぼす影響を示す図である。

【図3】実施例1の化合物が、トランスフォーミング成長因子(TGF- β 1)、細胞外マトリックスタンパク質(フィブロネクチン、コラーゲンIVおよびコラーゲンI)ならびに炎症性因子(F4/80)の生成に及ぼす影響を示す図である。

【図4】実施例1の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図5】実施例2の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図6】実施例3の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図7】実施例4の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図8】実施例5の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図9】実施例6の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図10】実施例7の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図11】実施例8の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図12】実施例9の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【図13】比較例1の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲンI α 1抑制効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

以下、実施例および実験例を挙げて本発明をより具体的に説明する。これらの実施例および実験例は、本発明を説明するためのもので、本発明の範囲を限定するものではない。

また、以下に記載された試薬および溶媒は、特別な言及がない限り、Sigma-Aldrich Korea、Alfa Aesar、またはTokyo Chemical Industry(TCI)から購入したものであり、 ^1H -NMRデータはJEOL社のEclipse FT 300MHz Spectrometerで測定した値であり、 ^{13}C -NMRデータはJEOL社のEclipse FT 300MHz Spectrometerで測定した値であり、MassデータはJEOL社のMStation JMS 700 mass Spectrometerで測定した値である。

【実施例】

【0035】

実施例1：1-(ピリジン-2-イル)-3-フェニル-4-プロピル-1H-ピラゾ

10

20

30

40

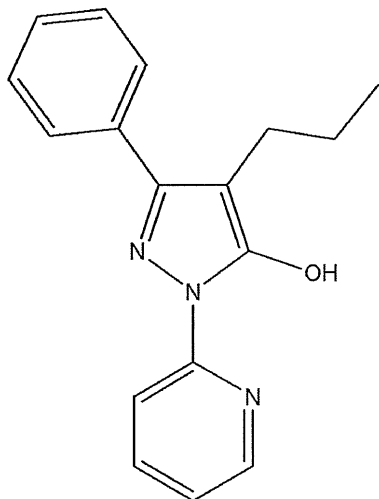
50

ール - 5 - オール・H C l [1-(pyridine-2-yl)-3-phenyl-4-propyl-1H-pyrazol-5-ol・H C l]の合成 (以下、18-278化合物)

段階1: 1-(ピリジン-2-イル)-3-フェニル-4-プロピル-1H-ピラゾール-5-オール[1-(pyridine-2-yl)-3-phenyl-4-propyl-1H-pyrazol-5-ol]の合成

【0036】

【化1】



・・・[化学式1]

【0037】

丸底フラスコに2-プロピル-3-オキソ-3-フェニルプロピオン酸エチルエステル(2.52g、10.7mmol)とエタノール10mLを入れ、2-ヒドラジノピリジン(1.29g、11.8mmol)をエタノール3mLに希釈して0℃でゆっくりと滴下した。3日間100℃で加熱還流した。減圧蒸留して溶媒を除去し、生成された固体をヘキサンと酢酸エチルで洗浄した後、真空乾燥して前記化学式1の化合物を82%の収率で得た。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) 12.50 (1H, s), 8.27-8.25 (1H, m), 8.01 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.81 (1H, m), 7.69 (2H, m), 7.48-7.34 (3H, m), 7.14-7.10 (1H, m), 2.54 (2H, d, J = 7.5 Hz), 1.64 (2H, m), 0.93 (3H, t, J = 7.3 Hz);

EIMS (70 eV) m/z (rel intensity) 279 (M⁺, 37), 250 (100).

【0038】

段階2: 1-(ピリジン-2-イル)-3-フェニル-4-プロピル-1H-ピラゾール-5-オール・H C lの合成 (278)

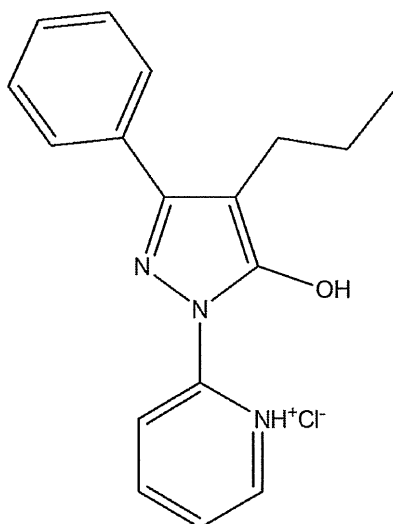
【0039】

10

20

30

【化 2】



・・・ [化学式 2]

10

【 0 0 4 0】

丸底フラスコに、段階 1 で製造した 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール 280 mg をエチルエーテル 4 mL に溶解した。ここで、2 M の HCl が溶解したエチルエーテル 0.55 mL を 0 でゆっくりと滴下した。前記反応溶液から生成された固体を減圧濾過して溶媒を除去し、ヘキサンと酢酸エチルで洗浄した後、真空乾燥して化学式 2 の化合物 270 mg を得た。

20

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) 8.44 (1H, d, $J = 4.2$ Hz), 8.08-8.03 (2H, m), 7.66-7.64 (2H, m), 7.48-7.42 (3H, m), 7.34-7.30 (1H, m), 2.49 (2H, brs), 2.43 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.48 (2H, m), 0.48 (3H, t, $J = 7.3$ Hz).

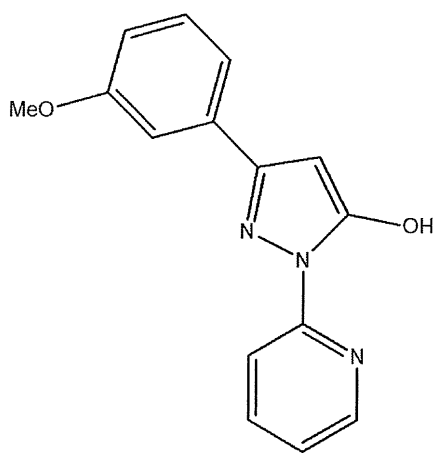
【 0 0 4 1】

実施例 2 : 3 - (3 - メトキシフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール [3-(3-methoxyphenyl)-1-(pyridine-2-yl)-1H-pyrazol-5-ol] の合成 (18-001)

【 0 0 4 2】

30

【化 3】



・・・ [化学式 3]

40

【 0 0 4 3】

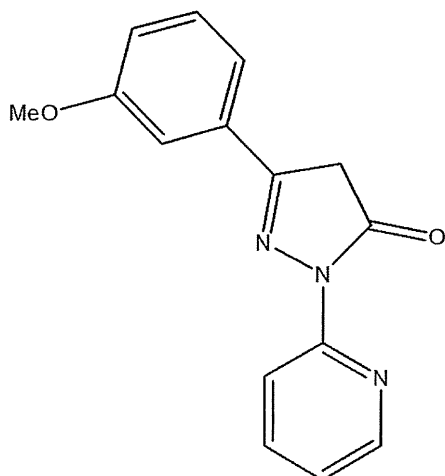
韓国登録特許 10 - 0942382 号に開示された合成方法に従って、前記化学式 3 の化合物を合成した。具体的には、丸底フラスコに 3 - (3 - メトキシフェニル) - 3 - オキソ - プロピオン酸エチルエステル (1 当量) とエタノール 4 mL を入れ、ここに 2 - ヒドラジノピリジン (1.1 当量) をエタノール 3 mL に希釈して 0 でゆっくりと滴下した。20 分間加熱還流した。減圧蒸留して溶媒を除去し、生成された固体をヘキサンと酢

50

酸エチルで洗浄した後、真空乾燥して化学式 3 の化合物を 6 7 % の収率で得た。

【 0 0 4 4 】

【 化 4 】



... [化学式 3']

10

【 0 0 4 5 】

化学式 3 の化合物と化学式 3' の化合物はエノール型とケト型の関係である。したがって、化学式 3 の化合物は、ケト - エノール互変異性反応によって化学式 3' の化合物として存在することもできる。

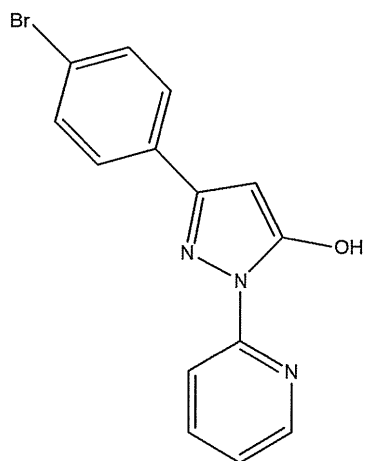
20

【 0 0 4 6 】

実施例 3 : 3 - (4 - ブロモフェニル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 5 - オール [3-(4-bromophenyl)-1-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-5-ol] の合成 (以下、 1 8 - 0 6 6 化合物)

【 0 0 4 7 】

【 化 5 】



... [化学式 4]

30

【 0 0 4 8 】

韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 1 - 0 0 2 5 1 4 9 号に開示された合成方法に従って製造した。具体的には、100 mL の丸底フラスコにエチル 4 - ブロモベンゾイルアセテート (製造社 : Aldrich) (10 mmol、製造社 : Aldrich) とエタノール (10 mL) を入れ、2 - ヒドラジノピリジン (10 mmol、製造社 : Aldrich) をエタノール (10 mL) に溶かした溶液を前記フラスコに添加した。100 で 8 時間攪拌した後、室温で冷却した。生成した固体を濾過し、エタノールとヘキサンで洗浄した後、固体を真空乾燥して化学式 4 の化合物を得た。

収率 : 8 1 % (2 . 5 g、8 . 0 mmol) ;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 12.8 (br, 1H) 8.30-8.28 (m, 1H), 8.03 (d, 1H, J = 8.5

40

50

Hz), 7.94-7.88 (m, 1H), 7.73 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.54 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.21-7.16 (m, 1H), 5.91 (s, 1H);

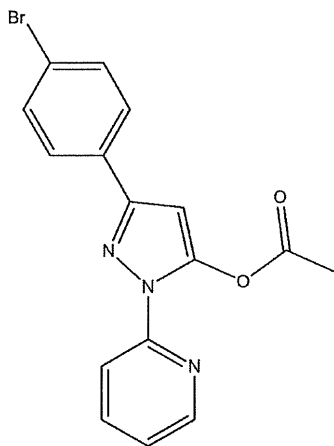
EIMS (70eV) m/z (rel intensity) 315 (M⁺, 25), 317 (M⁺, 26), 101 (19), 79 (100).

【0049】

実施例4：3-(4-ブロモフェニル)-1-(ピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-イルアセテート[3-(4-bromophenyl)-1-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-5-yl acetate]の合成(以下、18-067化合物)

【0050】

【化6】



・・・[化学式5]

【0051】

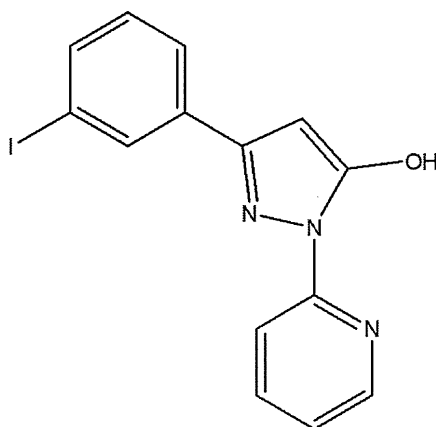
実施例3で合成した3-(4-ブロモフェニル)-1-(ピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-オール(3mmol、1当量)を10mLのCHCl₃に溶かした後、0でトリエチルアミンを1.2当量添加した。その後、塩化アセチルを1当量加え、10分間還流した。反応が終結した後、溶液にH₂O(10mL)を加え、CHCl₃で抽出した。有機層を無水のMgSO₄で乾燥し、濾過して濃縮した後、カラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：EA=5：1(v/v))で分離して、化学式5の化合物を製造した。

【0052】

実施例5：3-(3-ヨードフェニル)-1-(ピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-オール[3-(3-iodophenyl)-1-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-5-ol]の合成(以下、18-082化合物)

【0053】

【化7】



・・・[化学式6]

【0054】

韓国公開特許第10-2011-0025149号に開示された合成方法に従って製造

10

20

30

40

50

した。具体的には、100 mL の丸底フラスコにエチル 3 - ヨードベンゾイルアセテート (10 mmol、製造社：Aldrich) とエタノール (10 mL) を入れ、2 - ヒドラジノピリジン (10 mmol、製造社：Aldrich) をエタノール (10 mL) に溶かした溶液を、前記フラスコに添加した。

100 で 8 時間攪拌した後、室温で冷却した。生成した固体を濾過し、エタノールとヘキサンで洗浄した後、固体を真空乾燥して化学式 6 の化合物を得た。

収率：80.4%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 12.84 (br, 1H) 8.31-8.29 (m, 1H), 8.25-8.24 (m, 1H), 8.08-8.04 (m, 1H), 7.95-7.89 (m, 1H), 7.81-7.77 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.23-7.13 (m, 2H), 5.91 (s, 1H).

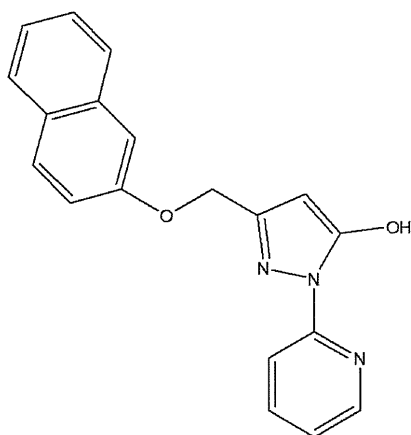
10

【0055】

実施例 6：3 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ)メチル) - 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 1H - ピラゾール - 5 - オール[3-((naphthalen-3-yloxy)methyl)-1-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-5-ol] (6b) の合成 (以下、18-095 化合物)

【0056】

【化 8】



20

... [化学式 7]

【0057】

韓国公開特許第 10 - 2011 - 0025151 号に開示された合成方法に従って製造した。具体的に下記段階 1 および 2 に基づいて合成した。

30

【0058】

段階 1：エチル 4 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) - 3 - オキソブタノエート[ethyl 4-(naphthalen-3-yloxy)-3-oxobutanoate]の合成

25 mL の丸底フラスコに 2 - ナフタレンオキシ酢酸(2-naphthalenoxy acetic acid) (4b、404.4 mg、2.0 mmol、製造社：Fluka) を入れ、無水ベンゼン 28 mL に溶かした後、塩化オキサリル(oxalyl chloride、0.338 mL、4.0 mmol、製造社：Aldrich) をゆっくりと加え、触媒として DMF を少量加えた後、室温で 2 時間攪拌し、濃縮した後、塩化メチレンで溶かした。

その後、温度を 0 に冷却した後、メルドラム酸(Meldrum's acid) (323 mg、2.24 mmol) を 2 mL の塩化メチレンに溶かした溶液をゆっくりと加え、1 mL のピリジンをゆっくりと加えた後、室温で 18 時間攪拌した。TLC で反応完結を確認した後、1.5 mL の 2 M HCl と氷を添加して反応を終結させ、飽和塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。その後、溶媒をすべて除去するために真空乾燥した後、30 mL のエタノールに溶かし、冷却コンデンサーを差し込み、60 で 20 時間加熱還流させた。反応混合物を濃縮してエタノールを除去し、酢酸エチルで抽出し、飽和塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した後、カラムクロマトグラフィー(column chromatography) (n - Hex / EtOAc = 10 / 1 (v / v)) で精製して、エチル 4 - ((ナフタレン - 3 - イルオキシ) - 3 - オキソブタノエートを製造した。

40

50

収率 61%

【0059】

段階2: 3-(3-(1-(ピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-オール)メチル)-1-(ナフタレン-3-イルオキシ)エチルエーテルの合成

25 mL の丸底フラスコにエチル 4-(ナフタレン-3-イルオキシ)-3-オキソブタノエート (5a, 1.2 g, 5.4 mmol) を入れ、10 mL のエタノールに溶かした後、100 で 2-ヒドラジノピリジン (0.55 g, 5.0 mmol) を 5 mL のエタノールに溶かした溶液を、30 分間ゆっくりと添加した後、20 時間攪拌した。その後、TLC で反応終結を確認し、反応溶液を蒸発(evaporation)させて濃縮した後、酢酸エチルで抽出し、飽和塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した後、カラムクロマトグラフィー(column chromatography) (n-Hex/EtOAc = 9/1 (v/v)) で精製して、化学式7の化合物を得た。

10

収率 65.2% ;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 12.76 (br, 1H) 8.29-8.27 (m, 1H), 7.97-7.87 (m, 2H), 7.79-7.74 (m, 3H), 7.49-7.41 (m, 1H), 7.37-7.15 (m, 4H), 5.76 (s, 1H), 5.15 (s, 2H); EIMS m/z (rel intensity) 317 (M⁺, 100), 174 (99), 106 (7)

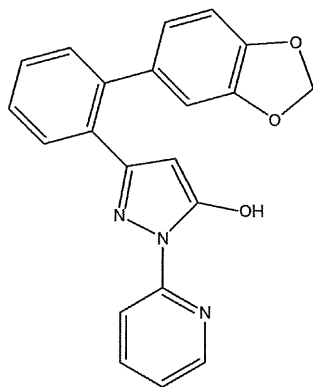
【0060】

実施例7: 3-(2-(2-(ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)フェニル)-1-(ピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-オール[3-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)phenyl)-1-(pyridine-2-yl)-1H-pyrazol-5-ol]の合成 (以下、18-177化合物)

20

【0061】

【化9】



... [化学式8]

30

【0062】

韓国公開特許第10-2011-0025149号に開示された合成方法に従って化学式8の化合物を製造した。

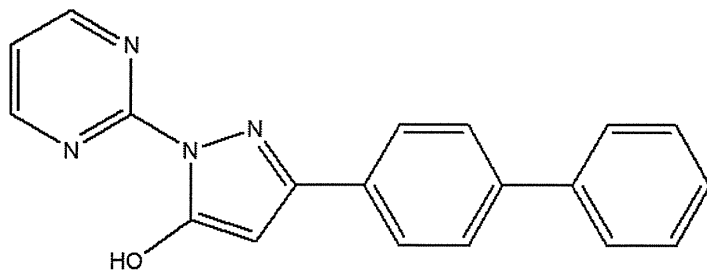
【0063】

実施例8: 3-(4-(2-(2-(ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)フェニル)-1-(ピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-オール[3-(biphenyl-4-yl)-1-(pyrimidin-2-yl)-1H-pyrazol-5-ol]の合成 (以下、18-186化合物)

40

【0064】

【化 1 0】



・・・ [化学式 9]

10

【 0 0 6 5】

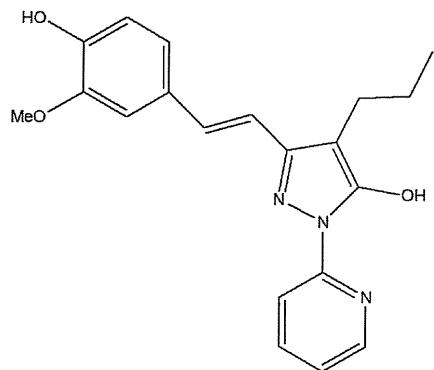
韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 1 - 0 0 2 5 1 4 9 号に開示された合成方法に従って化学式 9 の化合物を製造した。

【 0 0 6 6】

実施例 9 : 3 - { 2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニル) ビニル } - 4 - プロピル - 1 - (2 - ピリジニル) ピラゾール - 5 - オール[3-{2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)vinyl}-4-propyl-1-(2-pyridinyl)pyrazol-5-ol]の合成 (以下、 1 8 - 2 7 3 化合物)

【 0 0 6 7】

【化 1 1】



・・・ [化学式 1 0]

20

【 0 0 6 8】

(E) - エチル 5 - [4 - (t e r t - ブチルジメチルシリルオキシ) - 3 - メトキシフェニル] - 3 - オキソ - 2 - プロピルペンタノエート{(E)-ethyl 5-[4-(tert-butyl dimethylsilyloxy)-3-methoxyphenyl]-3-oxo-2-propyl pentanoate} (1 . 0 2 g 、 2 . 4 2 m m o l) を酢酸(acetic acid) [5 m L] に溶かした溶液に、 2 - ヒドラジノピリジン(2-hydrazinopyridine) [2 6 6 m g 、 2 . 4 4 m m o l] を加えて加熱還流下で 2 日間攪拌した。反応溶液を減圧蒸留して濃縮した後、酢酸エチル (1 5 m L) と水 (5 m L) を加えて抽出した (× 3 回) 。有機層は、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、カラムクロマトグラフィー [ヘキサン (H e x) : 酢酸エチル (E t O A c) = 1 5 : 1] で精製して 3 - { 2 - (4 - t e r t - ブチルジメチルシリルオキシ - 3 - メトキシフェニル) ビニル } - 4 - プロピル - 1 - (2 - ピリジニル) ピラゾール - 5 - オール[3-{2-(4-tert-butyl dimethylsilyloxy)-3-methoxyphenyl}vinyl]-4-propyl-1-(2-pyridinyl)pyrazol-5-ol] (6 7 6 m g 、 6 9 %) を得た。

40

前記化合物 (9 9 m g 、 0 . 2 1 m m o l) をメタノール (M e O H) [1 m L] に溶かした後、濃塩酸 (0 . 0 2 m L 、 0 . 2 5 m m o l) を加えた。反応溶液を 1 日間攪拌した。減圧して溶媒を除去して固体を得た。得られた固体を真空乾燥して、前記化合物 (7 4 m g 、 9 8 %) を得た。

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 8.46 (1H, m), 8.30 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.95 (1H, m), 7.43-6.81 (6H, m), 3.72 (3H, s), 2.42 (2H, t, J = 7.2 Hz), 1.53 (2H, q, J =

50

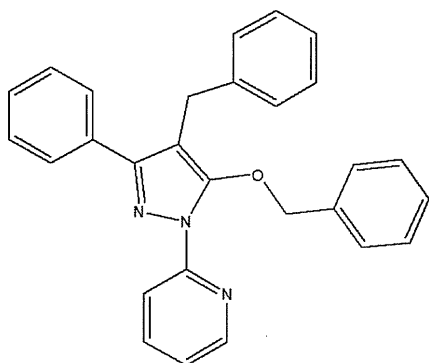
9.0 Hz) , 0.91 (3H, t, J = 9.0 Hz).

【 0 0 6 9 】

比較例： 3 - フェニル - 4 - ベンジル - 5 - ベンジルオキシ - 1 - (2 - ピリジニル)
ピラゾール[3-phenyl-4-benzyl-5-benzoyloxy-1-(2-pyridinyl)pyrazole]の合成 (以下、
1 8 - 2 3 3 化合物)

【 0 0 7 0 】

【 化 1 2 】



・ ・ ・ [化学式 1 1]

【 0 0 7 1 】

1 0 m L の丸底フラスコに 3 - フェニル - 4 - ベンジル - 1 - (ピリジン - 2 - イル)
- 1 H - ピラゾール - 5 - オール[3-phenyl-4-benzyl-1-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-5-o
l] (1 0 0 m g 、 0 . 3 0 m m o l) 、 炭酸カリウム (potassium carbonate) [5 8 m g
、 0 . 4 2 m m o l] 、 D M F (1 m L) を入れて常温で 1 0 分間攪拌した。臭化ベンジ
ル (benzyl bromide) [5 5 μ L 、 0 . 4 6 m m o l] を加えて 2 時間攪拌した。H₂O (3 m L) を加え、酢酸エチル (3 \times 5 m L) で抽出した。M g S O₄ で水を除去してろ過
した。カラムクロマトグラフィー (H e x : E t O A c = 2 : 1) で分離して、前記化学
式 1 1 の化合物 (6 5 m g 、 5 2 %) を得た。

¹H NMR (300 MHz, C D C l₃) 8.61-8.59 (m, 1H), 8.06 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 7.80 (t,
1H, J = 8.4 Hz), 7 .58-7.48 (m, 5H), 7.21-7.07 (m, 7H), 6.96 (d, 2H J = 7.9 Hz)
, 6.55 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 4.91 (s, 2H) , 3.69 (s, 2H); E I - M S (70 e V) m / z (r e l i
ntensity) 417 (M⁺, 6), 339 (39), 326 (61), 296 (40), 206 (26), 193 (85), 121 (15
) , 91 (100)

【 0 0 7 2 】

実施例 1 0 : 本発明の化合物による実験動物の状態変化の確認

すべての動物実験は、イファ動物実験倫理委員会の規定に従って進めた。第 1 型糖尿病
モデルにおける本発明の化合物の効果を調べるために、ストレプトゾトシン (streptozoto
cin) を 5 0 m g / k g で 5 日間投与した 8 週齢の C 5 7 B L / 6 J マウスの血中糖数値を
確認した後 (Hwang I, Lee J, Park J, Huh JY, Lee HB, Ho YS, Ha H: Catalase deficien
cy accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. Diabetes: 7
28-738, 2012)、本発明の実施例 1 の化合物である 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フ
ェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・H C l を、1 0 m g / k g / 日
(d a y) で 1 2 週間経口投与した。1 2 週間後に解剖して分析し、血液を採取して血糖
値、ヘモグロビン A 1 c (hemoglobin A1c ; H b A 1 c) 、血漿クレアチニン (plasma cr
eatinine) を測定し、尿を回収して尿タンパク (urine protein) を測定した。血糖値、H b
A 1 c 、血漿クレアチニン、尿タンパクは、それぞれジョンソン・エンド・ジョンソン社
の O N E T O U C H U l t r a 、S I E M E N S 社の D C A 2 0 0 0 + A n a l y z e r 、A r b o r A s s a y s 社の D e t e c t X S e r u m C r e a t i n i n e
D e t e c t i o n k i t および B i o - R a d L a b o r a t o r i e s 社の B i o
- R a d p r o t e i n a s s a y k i t を用いて測定した。対照群 (W T) 、糖尿
病群 (D M) および実施例 1 の化合物処理群 (D M + 実施例 1 の化合物) は、それぞれ、
第 1 型糖尿病非誘発群、第 1 型糖尿病誘発群、および第 1 型糖尿病を誘発した後に実施例

10

20

30

40

50

1の化合物で処理した群を意味する。

本発明の化合物による実験動物の状態変化は、下記の表1に示す。

【0073】

【表1】

	対照群 (WT)	糖尿病群 (DM)	実施例1の化合物処理群 (DM+実施例1の化合物)
体重(g)	30±1	22±1*	23±1*
血液 グルコース(mg/dl)	162±11	549±13*	531±21*
HbA1c(%)	4.5±0.1	10.0±0.4*	10.4±0.3*
腎臓重量(g)	0.19±0.01	0.22±0.01*	0.22±0.01*
腎臓重量/体重 比 (g/kg)	6.3±0.1*	10.3±0.5*	9.9±0.5*
血中(血漿)クレアチニン (mg/dl)	0.19±0.03	0.24±0.03	0.25±0.04
尿アルブミン(対照群に 対する相対的数値)	1.00±0.03	1.55±0.09*	1.26±0.04†

【0074】

前記表1のデータは、各群につき8～12匹のマウスの平均値(mean)±標準誤差(SE)で表す。各群間の統計的な比較は、分散分析(ANOVA)とフィッシャーのLSD(Fisher's least significant difference)法で検定した。P値が0.05未満である場合に有意であると判定した(*P<0.05 vs WT、†P<0.05 vs DM)。

【0075】

表1に示すように、対照群(WT)と比較して、糖尿病群(DM)では体重が減少し、血糖値およびhemoglobin A1c値が増加したことからみて、第1型糖尿病誘発後12週間高血糖状態が維持されたことが分かった。そして、腎臓重量、および腎臓重量/体重の比も増加したことからみて、腎肥大症(hypertrophy)が出現したことが分かった。血中(血漿)クレアチニンには対照群と比較して有意差は見られなかったが、アルブミン排泄は増加したことが分かった。一方、糖尿病を誘発させ、本発明の実施例1の化合物である1-(ピリジン-2-イル)-3-フェニル-4-プロピル-1H-ピラゾール-5-オール・HClを投与したマウス(実施例1の化合物処理群)では、糖尿病群と比較して、体重、血糖値、hemoglobin A1c値、腎臓重量、腎臓重量/体重の比、血中クレアチニンに有意差は見られなかったが、尿アルブミンは減少することが認められた。

したがって、本発明の化合物(1-(ピリジン-2-イル)-3-フェニル-4-プロピル-1H-ピラゾール-5-オール・HCl)は、糖尿病性腎症に伴うタンパク尿(アルブミンの排泄など)を減少させ、腎保護効果を有することが認められた。

【0076】

実施例11：糸球体肥大および糸球体メサンギウム細胞の拡張の確認

糸球体肥大および糸球体メサンギウム細胞の形成を確認するための形態学的分析には、論文(Lee EA, Seo JY, Jiang Z, Yu MR, Kwon MK, Ha H, Lee HB: Reactive oxygen species mediate high glucose-induced plasminogen activator inhibitor-1 up-regulation in mesangial cells and in diabetic kidney. Kidney Int.67:1762-71, 2005)に開示された染色技術方法が用いられた。

実施例10に記載したようにマウスに糖尿病を誘発し、本発明の実施例1の化合物である1-(ピリジン-2-イル)-3-フェニル-4-プロピル-1H-ピラゾール-5-オール・HClで処理し、12週間後に解剖して0.1M PBS(phosphate-buffered s

aline)で心臓灌流(perfusion)を行った後、2 % P L P (paraformaldehyde-lysine- periodic acid)で一晩組織を固定した。70 %エタノールで1時間、80 %エタノールで1時間、90 %エタノールで1時間、95 %エタノールで1時間を2回、100 %エタノールで1時間を3回、キシレン(xylene)で30分を2回、パラフィンで30分、パラフィンで1時間30分の順に処理して、パラフィン包埋を実施した。パラフィン組織は、厚さ4 μmの切片にスライスし、P A S (periodic acid-Schiff)染色を行って、基底膜とグリコーゲン(glycogen)沈着を検出した。一つの腎臓組織において30個の糸球体をスキャンし、糸球体の大きさと糸球体メサンギウム細胞の形成程度をImage-Pro Plus 4.5ソフトウェア(MEDIA CYBERNETICS社)を用いて測定した。糸球体の大きさは下記の式1によって計算した。

【0077】

【数1】

[式1]

$$\text{糸球体の大きさ} = (\text{糸球体の断面積})^{3/2} \times B / K$$

【0078】

[式中、 $B (= 1.38)$ は球体の形状係数であり、 $k (= 1.1)$ は粒度分布係数である。]

【0079】

前記実験結果は図1に示した。図1において、AはP A S (periodic acid-Schiff)で染色した糸球体を示す写真であり、Bは糸球体の体積(glomerular volume)を示すグラフであり、Cはメサンギウム部分の面積(fractional mesangial area)を示すグラフである。図1において、対照群(WT)、糖尿病群(DM)および実施例1の化合物処理群(実施例1の化合物)は、それぞれ、第1型糖尿病非誘発群、第1型糖尿病誘発群、および第1型糖尿病誘発後に実施例1の化合物で処理した群を意味する。図1のデータは、各群について8~12匹のマウスの平均値(mean)±標準誤差(SE)で表す。各群間の統計学的な比較は、分散分析(ANOVA)とフィッシャーのLSD(Fisher's least significant difference)法で検定した。P値が0.05未満の値である場合に有意であると判定した(* $P < 0.05$ vs WT、† $P < 0.05$ vs DM)。

【0080】

表2に示されるように、本発明の実施例1の化合物処理群における糸球体の大きさは、対照群と比較して増加したが、糖尿病群と比較すると有意に小さく、処理群における糸球体メサンギウム細胞の拡張は、糖尿病群と比較して対照群のレベルにまで減少した。

これらの結果から、本発明の化合物が、腎近位尿細管細胞において、細胞外マトリックスであるコラーゲンIのダウンレギュレーションにより、腎メサンギウムおよび尿細管間質内のコラーゲン蓄積を抑制することにより、腎線維症を防止できることが示された。

したがって、本発明の化合物(1-(ピリジン-2-イル)-3-フェニル-4-プロピル-1H-ピラゾール-5-オール・HCl)は、糖尿病性腎症が誘発された動物モデルにおいて、糸球体の大きさと糸球体メサンギウム細胞の拡張を減少させることにより、腎保護効果を有することが認められた。

【0081】

実施例12：コラーゲン蓄積抑制およびマクロファージの減少の確認

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色には、論文(Noh H, Kim JS, Han K-H, Lee GT, Song JS, Chung SH, Jeon JS, Ha H, Lee HB: Oxidative stress during peritoneal dialysis: implications in functional and structural changes in the membrane. Kidney Int. 69: 2022-2028, 2006)に記載された方法を用いた。

簡単に説明すると、実施例11に記載したようにマウスに糖尿病を誘発し、本発明の実施例1の化合物である1-(ピリジン-2-イル)-3-フェニル-4-プロピル-1H

10

20

30

40

50

- ピラゾール - 5 - オール・HCl で処理し、12 週間後に解剖して 0.1 M PBS (phosphate-buffered saline) で心臓灌流(perfusion)を行った後、2% PLP (paraformaldehyde-lysine-periodate) で一晚組織を固定した。70% エタノールで1時間、80% エタノールで1時間、90% エタノール1で時間、95% エタノールで1時間を2回、100% エタノールで1時間を3回、キシレン(xylene)で30分を2回、パラフィンで30分、パラフィンで1時間30分の順に処理してパラフィン包埋を実施した。パラフィン組織は厚さ4 μm の切片にスライスし、アルコールでパラフィンを除去した。抗体の浸透を高めるために、腎臓組織は、10 mM クエン酸緩衝液(citrate buffer、pH 6.0)に浸漬してマイクロ波で加熱(700ワットで5分、次いで100ワットで5分)した後、最終的に室温で30分インキュベートした。Peroxidase blocking reagent (Dakocytomation社のPeroxidase Blocking Reagent Ready-To-Use) で30分間処理して、内在性ペルオキシダーゼを除去した。次いで、Protein block serum-free 溶液(Dakocytomation社のProtein Blocking Serum-Free Ready-To-Use) と15分間インキュベートした後、1次抗体(Santa Cruz社のF4/80)と4で一晩インキュベートし、ABC kit (Santa Cruz社)を用いて、ABC(avidin-biotin-enzyme complex)法で増幅させた。Liquid DAB substrate chromogen system (Dakocytomation社)で発色した後、光学顕微鏡で観察した。

【0082】

マッソントリクローム(Masson's trichrome)およびピクロシリウスレッド(picrosirius red)染色

組織の損傷を調べるため、マッソントリクローム(Sigma-Aldrich社)およびピクロシリウスレッド(Sigma-Aldrich社)で、供給者の指示に従って染色を行った。組織損傷の程度は、面積あたりの尿細管間質内コラーゲン蓄積(collagen accumulation)量として表した。

【0083】

免疫組織化学染色(IHC F4/80)、マッソントリクローム(Masson's trichrome)染色およびピクロシリウスレッド(picrosirius red)染色の結果を図2に示した。図2において、対照群(WT)、糖尿病群(DM)および実施例1の化合物処理群(実施例1の化合物)は、それぞれ、第1型糖尿病非誘発群、第1型糖尿病誘発群、および第1型糖尿病誘発後に実施例1の化合物で処理した群を意味する。図2において、IHC F4/80に該当する図面で黒点がF4/80の発現を示し、マッソントリクローム(Masson's trichrome)とピクロシリウスレッド(picrosirius red)に該当する図面で、それぞれ青色と赤色がコラーゲンの発現を示す。

図2に示されるように、マッソントリクローム染色を行うと、対照群と比較して、糖尿病群では青色に染色された部位が多いことを確認することができた。また、マッソントリクローム染色を行うと、糖尿病群と比較して、実施例1の化合物処理群では青色に染色された部位が減少したことを確認することができた。ピクロシリウスレッド染色を行うと、対照群と比較して、糖尿病群では赤色に染色された部位が多いことを確認することができた。また、ピクロシリウスレッド染色を行うと、糖尿病群と比較して、実施例1の化合物処理群では赤色に染色された部位が減少したことを確認することができた。免疫組織化学染色(F4/80)を行うと、対照群と比較して、糖尿病群では黒色に染色された部位が多いことを確認することができた。また、免疫組織化学染色(F4/80)を行うと、糖尿病群と比較して、実施例1の化合物処理群では黒色に染色された部位が減少したことを確認することができた。

【0084】

上記の結果より、マッソントリクローム染色とピクロシリウスレッド染色で細胞外マトリックスの蓄積を検討したとき、糖尿病群では対照群に比べて、コラーゲンの蓄積が増加

することが示された。また、免疫組織化学染色により、糖尿病群では対照群に比べて、多量のマクロファージ (F 4 / 8 0) が検出された。一方、糖尿病を誘発し、本発明の実施例 1 の化合物である 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・H C l を投与したマウス (実施例 1 の化合物処理群) では、コラーゲン蓄積の増加およびマクロファージ (F 4 / 8 0) の増加が有意に減少することが確認できた。

したがって、本発明の化合物 (1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・H C l) は、糖尿病性腎症が誘発された動物モデルにおいて、コラーゲンの蓄積を抑制し、マクロファージ (F 4 / 8 0) 産生を減少させることにより、腎保護効果を示すことが認められた。

10

【 0 0 8 5 】

実施例 1 3 : 腎線維症抑制効果の確認 [リアルタイム P C R (realtime polymerase chain reaction) 分析]

T r i z o l 溶液 (I n v i t r o g e n 社) を用いて、製造社の指針に従いトータル R N A を単離した。単離されたトータル R N A を用いて、リアルタイム P C R を行った。

簡単に説明すると、実施例 1 0 に記載した方法により糖尿病を誘発し、本発明の実施例 1 の化合物である 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・H C l で処理し、1 2 週間後に解剖した。腎臓組織を摘出し、あらかじめ決められた量 (5 0 0 μ L) の T r i z o l 溶液 (I n v i t r o g e n 社) でホモジナイズした後、遠心分離 (1 3 , 0 0 0 r p m、1 0 分) し、上澄み液を回収した。クロロホルム (Chloroform) 2 0 0 μ L を加えて 1 5 分間反応させた後、遠心分離した。回収したトータル R N A は、イソプロピルアルコール (Isopropyl alcohol) で沈殿させ、7 5 % エチルアルコール (Ethyl alcohol) で洗浄し、実験に使用した。2 μ g のトータル R N A から、逆転写 k i t (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社) を用いて c D N A を生成し、A B I 7 3 0 0 r e a l - t i m e P C R t h e r m a l c y c l e r (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社) にて、S Y B R G r e e n P C R M a s t e r M i x k i t を用いて、供給者の指針に従い、選択的な m R N A 量を定量分析した。各実験は 2 0 μ L で 2 回 (duplicate) 実施し、正確な定量と、単一産物から得られた結果であることを確認するため、標準曲線 (standard curve) および解離曲線 (dissociation curve) が用いられた。P C R 反応は 9 5 ° で 1 5 秒間、5 6 ° で 1 分間を 4 0 サイクル繰り返した。遺伝子の増幅に使用したプライマーは、表 2 の通りであり、バイオニア社 (大田、韓国) にて作成された。リアルタイム P C R の結果を図 3 に示した。

20

30

【 0 0 8 6 】

【表 2】

遺伝子	フォワードプライマー配列	配列番号	逆方向プライマー配列	配列番号
コラーゲン I α 1	5'-CGGATAGCAGATTGAGAATCCG-3'	1	5' -CGGCTGAGTACGGAACACACA-3'	2
コラーゲン IV	5'-CAGGAGCTTCCCTGGTAGTCGTG-3'	3	5' -GGACAACCTTTGCTGCCTCA-3'	4
F 4 / 8 0	5'-CTGTAACCGGATGGCAAAC-3'	5	5' -ATGGCCAAGGCAAGACATAC-3'	6
フィブロネク チン	5'-CGGCGTATGCTGTCACTGGCCG-3'	7	5' -AAGTTGAAGGCAGCCACCTG-3'	8
T G F - β 1	5'-GGACTCTCCACCTGCAAGAC-3'	9	5' -GACTGGCGAGCCTTAGTTTG-3'	1 0
1 8 S r R N A	5'-CGAAAGCATTTGCCAAGAAT-3'	1 1	5' -AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'	1 2

40

【 0 0 8 7 】

図 3 において、A は 1 8 S r R N A に対する T G F - β 1 m R N A 発現量の比、B は 1 8 S r R N A に対するフィブロネクチン (fibronectin) m R N A 発現量の比、C は 1 8

50

S r R N A に対するコラーゲン I V m R N A 発現量の比、D は 1 8 S r R N A に対するコラーゲン(Collagen) I 1 m R N A 発現量の比、E は 1 8 S r R N A に対する F 4 / 8 0 m R N A 発現量の比をそれぞれ示すグラフである。図 3 において、対照群(WT)、糖尿病群(DM)および実施例 1 の化合物処理群(実施例 1 の化合物)は、それぞれ、第 1 型糖尿病非誘発群、第 1 型糖尿病誘発群、および第 1 型糖尿病誘発後に実施例 1 の化合物で処理した群を意味する。図 3 のデータは、各群につき、8 ~ 1 2 匹のマウスの平均値(mean) ± 標準誤差(SE)で表した。各群間の統計的な比較は、分散分析(ANOVA)とフィッシャーの LSD(Fisher's least significant difference)法で検定した。P 値が 0 . 0 5 未満である場合に有意であると判定した(* P < 0 . 0 5 v s W T、† P < 0 . 0 5 v s D M)。

10

図 3 に示されるように、糖尿病を誘発し、本発明の実施例 1 の化合物である 1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・H C l を投与したマウス(実施例 1 の化合物処理群)では、腎線維症に関連する因子である T G F - 1、細胞外マトリックス蛋白としてよく知られているフィブロンネクチン(fibronectin)、コラーゲン(collagen) I 1、コラーゲン I V、および炎症性因子である F 4 / 8 0 の発現量が、糖尿病群と比較して有意に減少した。

したがって、本発明の化合物(1 - (ピリジン - 2 - イル) - 3 - フェニル - 4 - プロピル - 1 H - ピラゾール - 5 - オール・H C l)は、腎臓線維化を抑制することにより、腎保護効果を有することが認められた。

【0088】

20

実施例 1 4 : 本発明の化合物による腎近位尿細管細胞におけるコラーゲン I 1 発現の抑制効果の確認

C 5 7 B L 6 / J 成体マウスの腎臓を微細に細切して得た近位尿細管の一部から誘導された近位尿細管細胞である m P r o x 2 4 は、日本国神奈川県聖マリアンナ医科大学の S u g a y a 教授から供給を受けた。m P r o x 2 4 は、1 0 % のウシ胎仔血清(FCS; Gibco)、1 0 0 U / m L のペニシリン、1 0 0 μ g / m L のストレプトマイシン、および 4 4 m M N a H C O ₃ が添加された D M E M (Dulbecco's modified Eagle's medium)で、5 % C O ₂ 雰囲気下、3 7 ° で培養した。R N A 発現レベルを測定するために、細胞を 6 - w e l l p l a t e で培養した。細胞が 9 0 % コンフルエントとなったとき、0 . 1 5 % のウシ胎仔血清(FCS; Gibco)が添加された新鮮な D M E M に交換して 2 4 時間培養することにより、細胞の増殖を停止させ、細胞の成長周期を同調させた。実施例 1 ~ 9 および比較例の各化合物を D M S O (dimethylsulfoxide)に 5 0 m M となるように溶かした後、1 0 m M、1 m M、0 . 1 m M、0 . 0 1 m M と段階的に希釈した。実施例 1 ~ 9 および比較例の各化合物の 1 0 m M、1 m M、0 . 1 m M、0 . 0 1 m M 溶液を、0 . 1 5 % のウシ胎仔血清(FCS; Gibco)が添加された D M E M で 1 0 0 0 倍に希釈して、最終濃度を 1 0 μ M、1 μ M、0 . 1 μ M、0 . 0 1 μ M とした。さらに、0 μ M (DMSO 1 μ L)を用いた。前記希釈液中で細胞を 1 時間インキュベートした後、組み換えヒトトランスフォーミング成長因子 - 1 (h T G F - 1、recombinant human transforming growth factor- 1、R & D S y s t e m s 社) 5 n g / m L の存在下に 6 時間インキュベートした。対照群(Control)には、h T G F - 1 を用いなかった。T r i z o l (I n v i t r o g e n 社)を用いて、m P r o x 2 4 からトータル R N A を抽出した。m R N A 発現の定量は、c D N A 転写物、プライマー対(prime r p a i r s)および S Y B R G r e e n P C R M a s t e r M i x (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社)を含む 2 0 μ L の反応液、ならびに S t e p O n e P l u s (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社)を用いて、リアルタイム P C R 法により行った(リアルタイム P C R 条件: 9 5 ° 1 0 分 9 5 ° で 1 5 秒の変性(denaturation)、6 0 ° で 1 分のプライマーアニーリング(primer annealing)を 4 0 サイクル繰り返し 融解曲線(melting curve)を測定するため、9 5 ° で 1 5 秒、6 0 ° で 1 分、9 5 ° で 1 5 秒)。定量は 1 8 S r R N A 発現量で標準化した。マウスコラーゲン I 1 プライマー対の配列は、5' - G A A C A T C A C C T A C C A C T G C A - 3' (配列番号 1 3)と 5

30

40

50

' - G T T G G G A T G G A G G G A G T T T A - 3 ' (配列番号 1 4) であった。また、マウスの 1 8 S r R N A のフォワードプライマー配列は 5 ' - C G A A A G C A T T T G C C A A G A A T - 3 ' (配列番号 1 1)、逆方向プライマー配列は 5 ' - A G T C G G C A T C G T T T A T G G T C - 3 ' (配列番号 1 2) であった。

【 0 0 8 9 】

前記実験結果を表 3 ~ 表 1 2 および図 4 ~ 図 1 3 に示した。表 3 ~ 表 1 2 および図 4 ~ 図 1 3 は、それぞれ実施例 1 ~ 9 の化合物および比較例 1 の化合物の近位尿細管細胞におけるコラーゲン I 1 発現に対する抑制効果を示す。

表 3 ~ 表 1 2 および図 4 ~ 図 1 3 のデータは、各濃度あたり 3 ~ 5 回繰り返して実験した結果であり、平均値(mean) ± 標準誤差 (S E) で表す。各群間の統計的な比較は、分散分析 (A N O V A) とフィッシャーの L S D (Fisher ' s least significant difference) 法で検定し、 P 値が 0 . 0 5 未満で有意であると判定した (* P < 0 . 0 5 v s W T 、 † P < 0 . 0 5 v s D M) 。

表 3 ~ 表 1 2 には、各群の 1 8 S r R N A の発現量 (1 8 S) に対するコラーゲン I 1 (C o l 1) の発現量の比の平均値(mean)、コラーゲン I 1 発現の抑制率(% of inhibition)および I C ₅₀ 値 (μ M) を示す。この際、抑制率は、対照群の抑制率を 1 0 0 % とし、h T G F - 1 で処理し、本発明の実施例に係る化合物または比較例に係る化合物で処理していない群 (T G F - 1) の抑制率を 0 % としたときの相対的な抑制率を意味する。

図 4 ~ 図 1 3 には各群の 1 8 S r R N A 発現量 (1 8 S) に対するコラーゲン I 1 (C o l 1) 発現量の比 [相対増加(relative increase)] を示す。

【 0 0 9 0 】

【表 3】

1 8 - 2 7 8	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0 . 1 0 7	0 . 0 3 4	1 0 0 . 0 0
0	1	0	0 . 0 0
0 . 0 1	0 . 8 2 1	0 . 0 5 8	2 0 . 0 4
0 . 1	0 . 7 0 1	0 . 0 3 7	3 3 . 4 8
1	0 . 5 1 6	0 . 0 4 9	5 4 . 2 0
1 0	0 . 3 6 9	0 . 0 2 6	7 0 . 6 6
I C ₅₀	0 . 7 4 2		

【 0 0 9 1 】

【表 4】

1 8 - 0 0 1	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0 . 1 8 6	0 . 0 2 9	1 0 0 . 0 0
0	1 . 0 0 0	0	0 . 0 0
0 . 0 1	0 . 7 4 8	0 . 0 8 4	3 0 . 9 6
0 . 1	0 . 6 9 8	0 . 1	3 7 . 1 0
1	0 . 6 4 2	0 . 0 4	4 3 . 9 8
1 0	0 . 3 4 5	0 . 0 2 5	8 0 . 4 7
I C ₅₀	3 . 1 9 1		

【 0 0 9 2 】

【表 5】

18-066	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0.289	0.035	100.00
0	1	0	0.00
0.01	0.785	0.123	30.24
0.1	0.717	0.089	39.80
1	0.726	0.04	38.54
10	0.583	0.059	58.65
IC ₅₀	2.137		

10

【0093】

【表 6】

18-067	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0.164	0.037	100.00
0	1.000	0	0.00
0.01	0.700	0.06	35.59
0.1	0.607	0.071	46.62
1	0.562	0.025	51.96
10	0.325	0.035	80.07
IC ₅₀	0.299		

20

【0094】

【表 7】

18-082	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0.246	0.065	100.00
0	1.000	0	0.00
0.01	0.710	0.097	39.51
0.1	0.605	0.051	53.81
1	0.391	0.035	82.97
10	0.312	0.027	93.73
IC ₅₀	0.105		

30

【0095】

【表 8】

18-095	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0.192	0.036	100.00
0	1.000	0	0.00
0.01	0.699	0.084	37.25
0.1	0.663	0.053	41.71
1	0.504	0.081	61.39
10	0.268	0.042	90.59
IC ₅₀	0.227		

40

【0096】

【表 9】

18-177	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0.267	0.037	100
0	1	0	0
0.01	0.96	0.166	5.46
0.1	0.839	0.077	21.96
1	0.742	0.129	35.20
10	0.438	0.084	76.67
IC ₅₀	1.310		

10

【0097】

【表 10】

18-186	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0.222	0.043	100.00
0	1.000	0	0.00
0.01	0.825	0.132	22.49
0.1	0.569	0.031	55.40
1	0.586	0.055	53.21
10	0.583	0.053	53.60
IC ₅₀	0.078		

20

【0098】

【表 11】

18-273	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0.283	0.06	100
0	1	0	0
0.01	0.408	0.033	82.57
0.1	0.835	0.092	23.01
1	0.832	0.072	23.43
10	0.46	0.045	75.31
IC ₅₀	1.776		

30

【0099】

【表 12】

18-233	平均	標準誤差	発現抑制率 (%)
対照群	0.186	0.027	100.00
0	1.000	0	0.00
0.01	0.933	0.047	8.23
0.1	0.757	0.029	29.85
1	0.712	0.045	35.38
10	0.656	0.04	42.26
IC ₅₀	10.24		

40

【0100】

図4～図13から確認できるように、本発明の実施例に係る化合物で処理した場合は、近位尿細管細胞における細胞外マトリックスであるコラーゲンI (Col1) の発

50

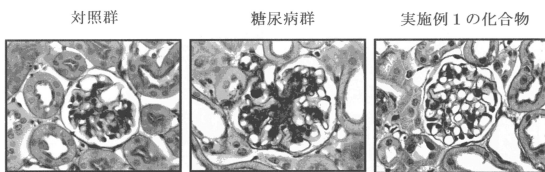
現量が減少した。また、近位尿細管細胞における細胞外マトリックスであるコラーゲン I 1 (C o l 1) の発現量は、概ね (例えば、実施例 9 の化合物を除く) 本発明の実施例に係る化合物の処理濃度に依存的に抑制された。比較例に係る化合物で処理した場合も、濃度依存的に細胞外マトリックスであるコラーゲン I 1 (C o l 1) の発現量が減少した。

しかし、本発明の実施例に係る化合物の IC_{50} 値が比較例に係る化合物の IC_{50} 値より少なくとも 3 倍低いため、本発明の化合物は、細胞外マトリックスであるコラーゲン I 1 (C o l 1) の発現をより効果的に抑制することを確認することができた。

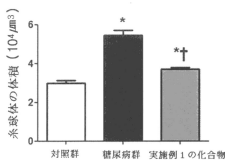
したがって、本発明の化合物は、近位尿細管細胞における細胞外マトリックスであるコラーゲン I 1 の発現を抑制して、尿細管間質内におけるコラーゲンの蓄積を抑制することにより、腎線維症を抑制できることを確認することができた。

10

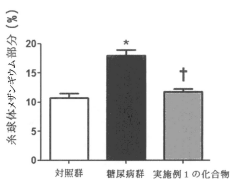
【図 1 A】



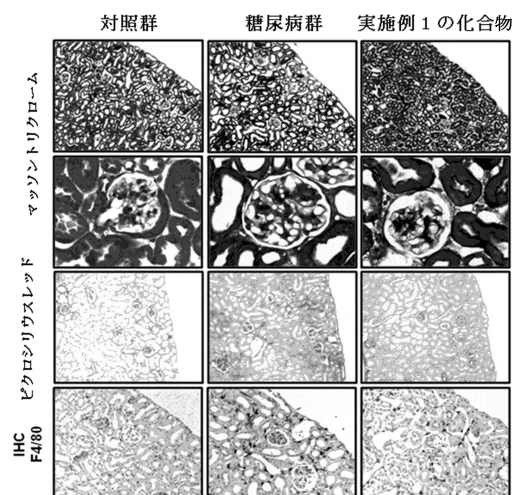
【図 1 B】



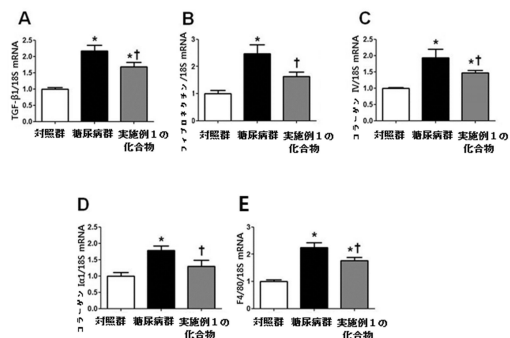
【図 1 C】



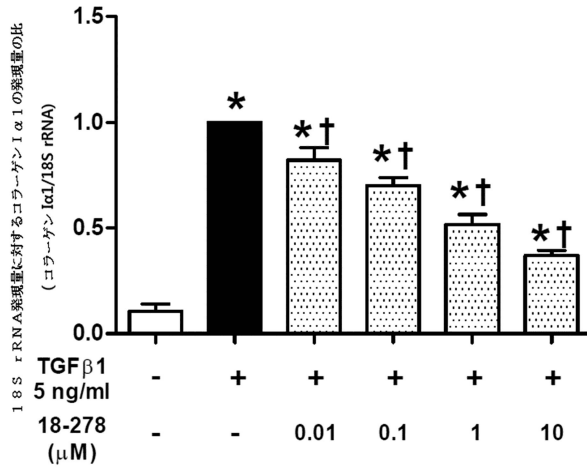
【図 2】



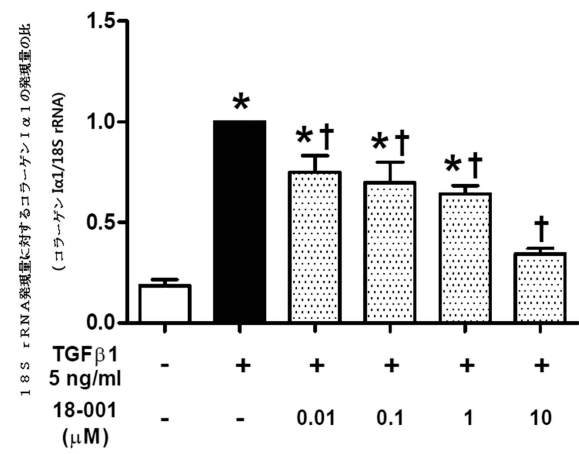
【図 3】



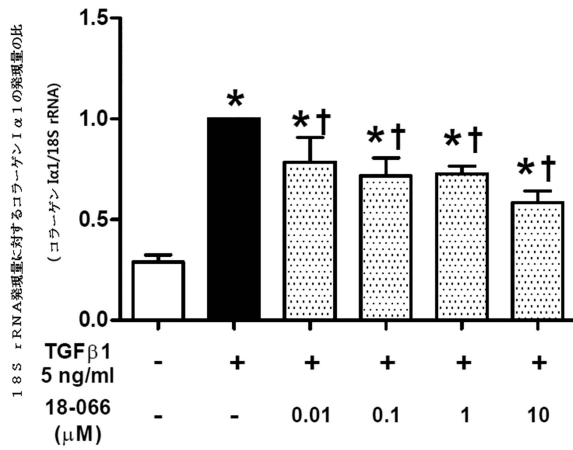
【図 4】



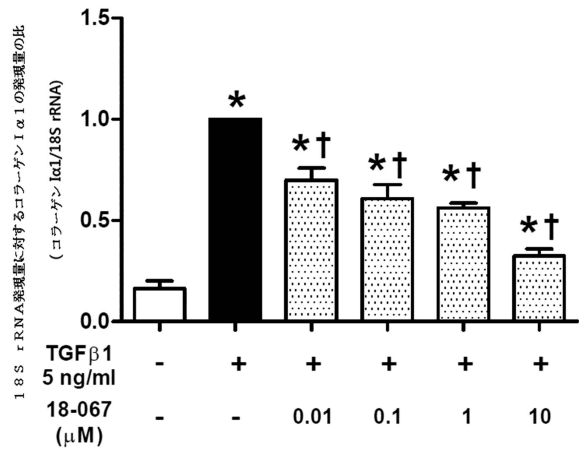
【図 5】



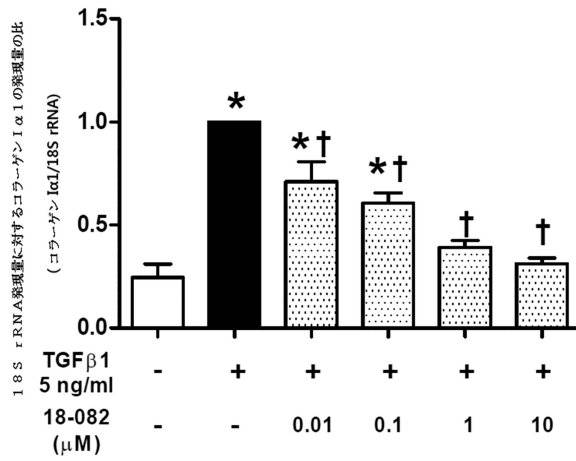
【図 6】



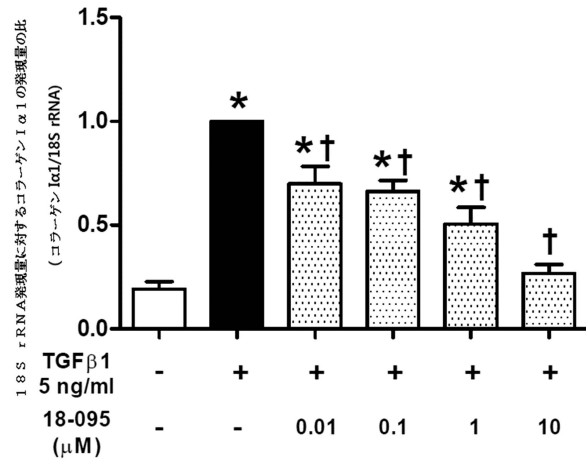
【図 7】



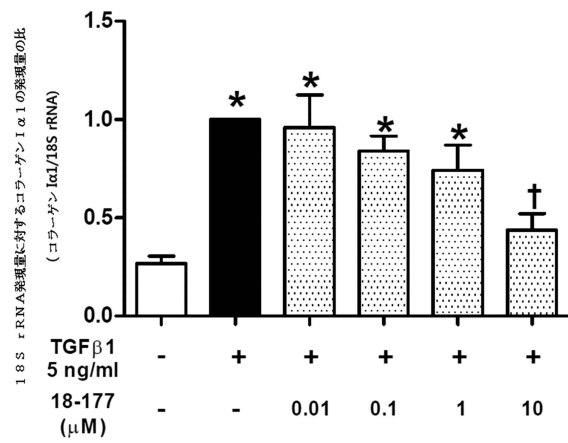
【図 8】



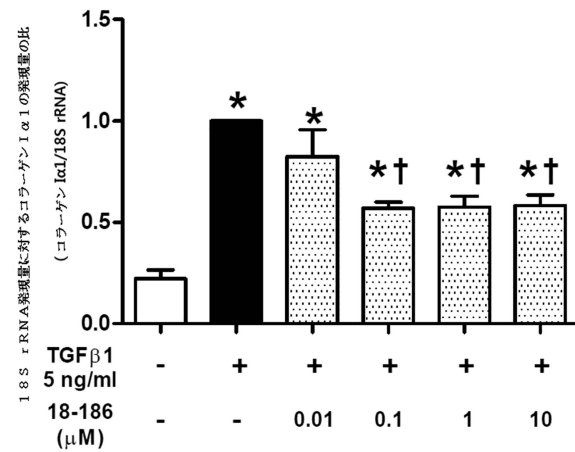
【図 9】



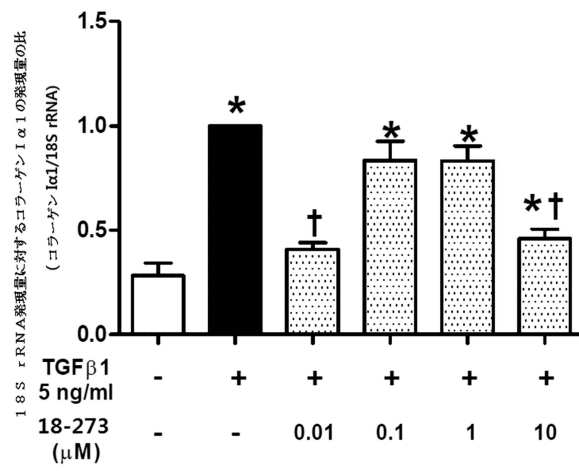
【図 10】



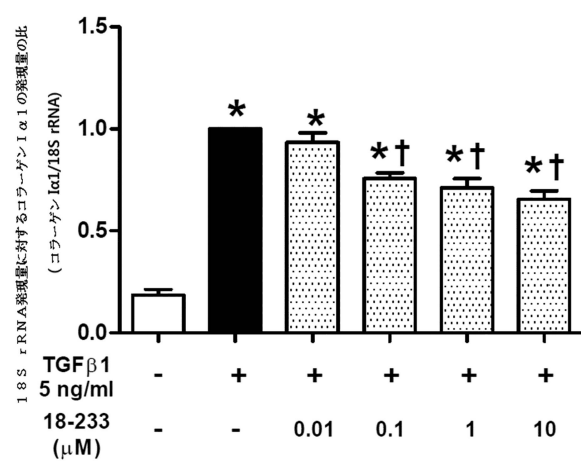
【図 11】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

0005974180000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀
- (74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (72)発明者 バエ、ユン ソー
大韓民国、キョンギ - ド 410 - 904 コヤン - シ、イルサンドン - グ、チャンハン 2 - ド
ン、レイク ポリス 1 チャ、エー - 1009
- (72)発明者 ハ、フン ジュ
大韓民国、ソウル 140 - 031 ヨンサン - グ、イチョン 1 - ドン、301 - 10、ロイヤ
ル アpartment、103
- (72)発明者 リー、ケー イン
大韓民国、テジョン 305 - 755 ユサン - グ、オウン - ドン、ハンビット アpartment
、113 - 305
- (72)発明者 ソン、キュン ヘ
大韓民国、ソウル 121 - 100 マポ - グ、ノゴサン - ドン、106 - 58、ハリム アカデ
ミーテル、101

審査官 幸田 俊希

- (56)参考文献 国際公開第09/119987(WO, A1)
韓国公開特許第10-2011-0025149(KR, A)
韓国公開特許第10-2004-0094464(KR, A)
米国特許第05292744(US, A)
欧州特許第02050745(EP, B1)
チャイルドヘルス, 2008年, 3(7), p.40-42

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 9/00
A61K 31/00
A61K 47/00
A61P 13/12
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)