

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) **特 許 公 報 (B2)**

(11) 特許番号

特許第4388600号  
(P4388600)

(45) 発行日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(24) 登録日 平成21年10月9日 (2009.10.9)

(51) Int.Cl.

F I

C07J 41/00 (2006.01)

CO 7 J 41/00

**A 6 1 K 31/573 (2006.01)**

A 6 1 K 31/573

**A 6 1 P 19/02 (2006.01)**

A 6 1 P 19/02

譜求項の数 6 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平10-517154
(86) (22) 出願日	平成9年10月2日 (1997. 10. 2)
(65) 公表番号	特表2001-501637 (P2001-501637A)
(43) 公表日	平成13年2月6日 (2001. 2. 6)
(86) 国際出願番号	PCT/EP1997/005426
(87) 国際公開番号	W01998/015568
(87) 国際公開日	平成10年4月16日 (1998. 4. 16)
審査請求日	平成16年9月16日 (2004. 9. 16)
(31) 優先権主張番号	M196A002048
(32) 優先日	平成8年10月4日 (1996. 10. 4)
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)

(73) 特許権者 398034032  
ニコックス エス エイ  
フランス、06560 ソフィア アンテ  
イポリス-ヴァルボンヌ、ルート デ  
ラインス-ビービー313 1681 タ  
イッソウニエレ エイチビー4  
Taissounieres HB4, 1  
681 route des Dolin  
es-BP313, 06560 Soph  
ia Antipolis-Valbon  
ne, France

(74) 代理人 100065248  
弁理士 野河 信太郎

[最終頁に続く](#)

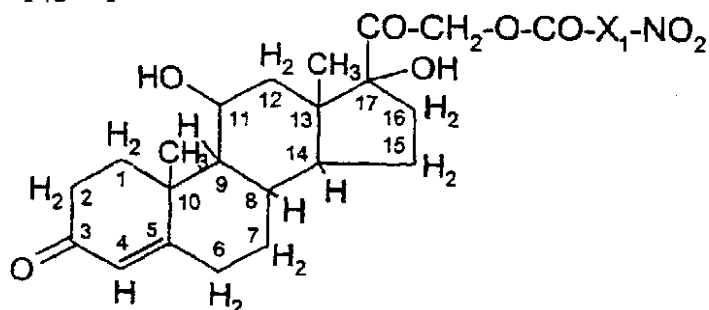
(54) 【発明の名称】 コルチコイド化合物の硝酸エステル類およびその薬学的使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式：

【化 1】



(式中、C H基における水素またはC H<sub>2</sub>基における2つの水素の個所において、次の置換基があってもよい：

1 - 2 位において：2重結合があってもよい；

9 位において：Fがあってもよい；

16位において： $\text{CH}_3$ があってもよい；

$X_1$  は 2 価の結合手：

- Y O -

(ここで、Yは、1～20の炭素原子を有する直鎖状もしくは可能なとき分枝しているア

ルキレンである)；

であり、ステロイド骨格を有する前駆体は、ヒドロコルチゾンおよびデキサメタゾンを含む)

の化合物またはそのエステルもしくは塩。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の化合物を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 3】

医薬用途が抗関節炎剤である請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

医薬用途が免疫抑制剤である請求項 2 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 5】

医薬用途が血管新生抑制剤である請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

医薬用途が抗喘息剤である請求項 2 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

この発明は、新規なコルチコイド化合物類の製造法に関するものである。

特に、抗炎症性、免疫抑制性および血管新生抑制(アンジオスタティック: angiostatic) 活性を有するステロイド構造の化合物(いわゆる、ステロイド抗炎症剤)に関するものである。

この発明の化合物は、一般にコルチコステロイド(コルチコイド)製剤が使用される病理学的症状の治療に有用であるだけでなく、利点も多い。

20

これは周知のコルチコイド製品よりも予期できないほどの利点を示す。事実、特定の製品の種々定義された治療用途を考慮すると、本発明の新規な化合物で、公知のコルチコイド類に関する結果のより良い組み合わせを見出すことが常に可能である。

いかなる予想にも反して、本発明の物質は、低い副作用と結びついた高い活性という改善された治療上のプロファイルを示すという事実によって特徴づけられる。

コルチコイド類は、炎症性疾患の治療における薬理的な手段の第一の選択肢としてよく知られている。例えば、ヒドロコルチゾン、コルチゾン、プレドニゾロン、プレドニゾン、フルドロコルチゾン、デスオキシコルチコステロン、メチルプレドニゾロン、トリウムシノロン、パラメタゾン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、トリウムシノロンアセトニド、フルオシノロンアセトニド、ベクロメタゾン、アセトキシプレグネロン等を含むこの種の薬剤は、さまざまな臓器に対して著しい薬物毒性作用を有している。そのため、それらの臨床上の使用や断続的な使用は、一連の副作用を引き起こし、それらの副作用のあるものは極めて重篤である。例えば、Goodman & Gilman: 「The Pharmaceutical Basis of Therapeutics」第 9 版、1459 ~ 1465 頁、1996 年参照。

30

これらの有毒な作用は以下のものを含む。

- 変化した細胞代謝および高い頻度の骨粗しょう症を誘発する骨に対するもの；
- 高血圧性の反応の原因となる循環器系に対するもの；
- 胃の障害を引き起こす胃腸管に対するもの。

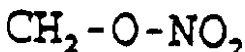
例えば、Martindale: 「The Extrapharmacopoeia」第 30 版、712 ~ 723 頁、1993 年参照。

40

上記の従来技術によれば、治療活性を副作用から分離することは殆ど不可能であることが分かる。上記の Goodman らの 1474 頁参照。

この技術分野で知られているのは、酸性の末端を伴ったまたは伴わない非ステロイド抗炎症剤であり、非酸性の末端については特許 WO 94 / 04484、WO 94 / 12463、WO 95 / 09831、WO 95 / 30641 参照、そしてこれらの特許には酸性末端のものも記載されている。

DE - A - 2222491 (1) は、21 位に基



|

50

を有するプレグナン誘導体を開示している。

この化合物類には、抗炎症、抗アレルギーおよびカルディオトロピック活性がある言われている。その単一化合物は血管拡張剤である。

US - A - 3 4 9 4 9 4 1 ( 2 ) は、冠不全、狭心症のような心疾患の治療に血管拡張剤として有用な、エストラン - 3 - オールまたはエストロ - 4 - エン - 3 - オンからのステロイド誘導体を開示している。この化合物類は、17位にナイトレート基に結合するエーテル結合手を有している。ナイトレート基は、ステロイド環の3位および16位にもあり得る。

Arzneimittel Forschung, vol.19, n.4, 1969, pp.584-685 ( 3 ) は、アンドロスタン誘導体の3 - および17 - 硝酸エステル、アンドロステンの3 - および17 - ジナイトレート誘導体、テストステロン誘導体の17 - 硝酸エステルおよびデソキシコルチゾン、コルチゾンおよびプレドニゾンの21 - 硝酸エステル誘導体を開示している。この文献には、デソキシコルチコステロンナイトレートが異なる臓器において蛋白質の同化作用を促進すると記述されている。

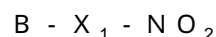
WO - A - 9 7 / 3 4 8 7 1 ( 4 ) は、( i ) ステロイド、 $\beta$  - アゴニスト、抗コリン作用薬、マストセルスタビライザー、少なくとも1つのNOまたはNO<sub>2</sub>基あるいはin vivoでNOまたはEDRF ( endothelium-derived relaxing factor ) の内因的生成を刺激する基が、酸素、硫黄、炭素および窒素のような位置を介して、直接または間接に結合しているPDE ( phosphodiesterase ) ; ( i i ) 臨床的に有効量のステロイド、 $\beta$  - アゴニスト、抗コリン作用剤、マストセルスタビライザー、あるいは少なくとも1つのNOもしくはNO<sub>2</sub>部分またはin vivoでNOもしくはEDRFの内因的生成を刺激する基で置換されていてもよいPDEインヒビターが、ナイトリックオキシドを供与、転移または放出する化合物および/またはin vivoでNOもしくはEDRFの内因的生成を刺激する化合物と組み合わせる組成物を開示している。

しかしながら、ステロイド物質はCOXと共有すべきものを有しておらず、まだ十分に説明されていない作用のより複雑な薬物毒性メカニズムを有しているのに対して、非ステロイド性物質の作用の薬物毒性メカニズムは、一つまたはそれ以上のシクロ - オキシゲナーゼ ( COX ) の阻害に基づいているので、ステロイド化合物類は非ステロイド化合物類とは化学的、薬理的および生化学的に全く異なっているということが認識されるべきである。

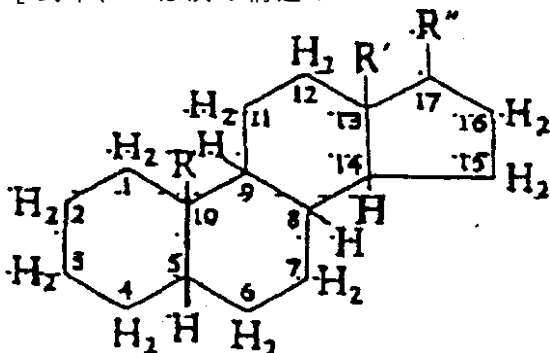
これら二つの化合物群が国際的な薬局方において完全に分離されたカテゴリーに分類されているということはよく知られている。

本出願人は、驚くべきことにまた予期しないことに、きわめて有効であり、当該技術分野で知られていたものより優れてさえいて、しかも同時に、予期しないことにそれらが上記の副作用を引き起こさず、あるいは引き起こしたとしてもその副作用が軽微であるため、公知のコルチコイド類より高い忍容性を有するコルチコステロイド類 ( コルチコイド類 ) を見出した。

本発明の目的は、一般式：



[ 式中、Bは次の構造：



( ここで、一般式中に示されたCH基における水素HまたはCH<sub>2</sub>基における2つの水素

10

20

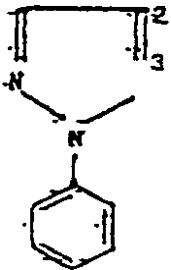
30

40

50

H<sub>2</sub>の個所において、次の置換基があってもよい：

- 1 - 2 位において：2重結合があってもよい；  
2 - 3 位において：次の置換基があってもよい；



10

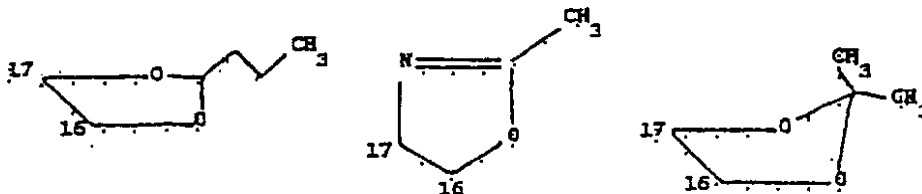
- 2 位において：Cl、Brがあってもよい；  
3 位において：CO、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl、OHがあってもよい  
4 - 5 位において：2重結合があってもよい；  
5 - 6 位において：2重結合があってもよい；  
6 位において：Cl、F、CH<sub>3</sub>、-CHOがあってもよい；  
7 位において：Clがあってもよい；  
9 位において：Cl、Fがあってもよい；  
11 位において：OH、CO、Clがあってもよい；  
16 位において：CH<sub>3</sub>、OH、=CH<sub>2</sub>があってもよい；  
17 位において：OH、CH<sub>3</sub>、OCO(O)<sub>ua</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>va</sub>CH<sub>3</sub>、もしくは

20



(ここで、uaは0または1に等しい整数であり、vaは0から4の整数である)があってもよい；

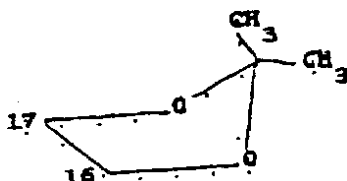
16 - 17 位において：次の基があってもよい



30

(ここで、RおよびR'は互いに同一であるかまたは異なって、水素または1から4の炭素原子を有する直鎖状もしくは分枝鎖状のアルキル、好ましくはR = R' = CH<sub>3</sub>があってもよい；

9 位にFがあり、11 位にOHがあり、1 - 2 位および4 - 5 位に2つの二重結合があり、3 位および20 位に2つのCO基があり、16 位および17 位に基：



40

があることのできないとき、

Bはコルチコステロイドの残基である；

R'は-(CO-L)<sub>t</sub>-(X)<sub>t1</sub>-であり、

ここで、tおよびt1は1に等しい整数である；

2価の架橋基Lは、

(CR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>)<sub>na</sub>(O)<sub>nb</sub>(CR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>)<sub>n'a</sub>(CO)<sub>n'b</sub>(O)<sub>n''b</sub>(CO)<sub>n''b</sub>(CR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>)<sub>n''a</sub>

から選択される。

50

(ここで、 $n_a$ 、 $n'_a$ および $n''_a$ は互いに同一であるかまたは異なって0から6の整数、好ましくは1から3の整数であり；

$n_b$ 、 $n'_b$ 、 $n''_b$ および $n'''_b$ は互いに同一であるかまたは異なって0または1に等しい整数であり；

$R_4$ および $R_5$ は互いに同一であるかまたは異なってH、1から5、好ましくは1から3の炭素原子を有する直鎖状または分枝鎖状のアルキルから選択され；

Xは $X_0 = 0$ 、NH、 $NR_{1C}$ （ここで $R_{1C}$ は1から10の炭素原子を有する直鎖状または分枝鎖状のアルキルである）に等しい；

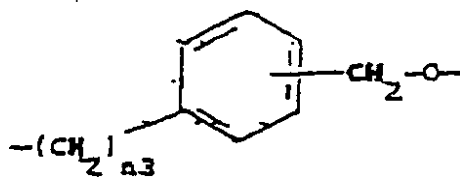
$X_1$ は2価の結合手であり、次のものから選択される：

- YO

10

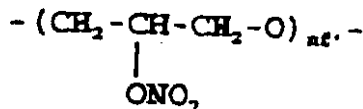
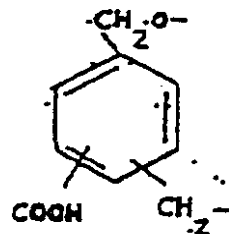
(ここで、Yは $C_1 - C_{20}$ 、好ましくは2から5の炭素原子を有する直鎖状もしくは可能なとき分枝しているアルキレン、または5から7の炭素原子を有する任意に置換されていてもよいシクロアルキレンである；

-  $Y_1$ は、



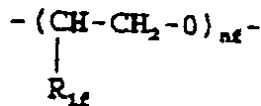
(ここで、 $n_3$ は0から3の整数である)；

20



30

(ここで、 $n_{f'}$ は1から6、好ましくは2から4の整数である；



(ここで、 $R_{1f} = H, CH_3$ であり、 $n_f$ は1から6、好ましくは2から4の整数である)

から選択される]

を有するコルチコステロイド類およびそれらのエステル類および塩類、ならびにそれらの抗炎症剤、免疫抑制剤およびアンジオスタティック剤としての用途にある。

40

言及することができて好ましい化合物は、Bが当該技術分野で公知の製法により得られる、下記に列挙されたものである。

例えば、ここで参照として組み込まれるメルク・インデックス第12版(1996年)に記載されている前駆物質および関連製法は、前駆物質および関連製法として言及され得る。

前駆物質(メルクの命名に従う)は次のものを含む。ここで、 $H_2$ 、H、R、 $R'$ 、 $R''$ は、以下に列挙された化合物において定義されたような意味を有する：ブデソニド、ヒドロコルチゾン、アルクロメタゾン、アルゲストン、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、クロロプレドニゾン、クロベタゾル、クロベタゾン、クロコルトロン、クロプレドノール、コルチゾン、コルチコステロン、デフラザコルト、デソニド、デソキシメタゾン、デキサ

50

メタゾン、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルプレドネート、フルアザコルト、フルクロロニド、フルメタゾン、フルニゾリド、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオコルチンブチル、フルオコルトロン、フルオロメトロン、フルペロロンアセテート、フルプレドニデンアセテート、フルプレドニゾロン、フルランドレノリド、フォルモコルタール、ハルシノニド、ハロベタゾールプロピオネート、ハロメタゾン、ハロプレドンアセテート、ヒドロコルタメート、ロテプレドノールエタボネート、メドリゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾロン、モメタゾンフロエート、パラメタゾン、プレドニカルベート、プレドニゾロン、プレドニゾロン 25 - ジエチルアミノアセテート、プレドニゾロンナトリウムフォスフェート、プレドニゾン、プレドニバル、プレドニリデン、リメキシロン、トリアムシノロン、21 - アセトキシプレグネノロン、コルチバゾール、

10

アムシノニド、フルチカゾンプロピオネート、マジプレドン、チクソコルトール、トリアムシノロンヘキサセトニド。  
上記で定義された  $X_1$  結合手は、上記で示された当該技術分野における公知の方法を用いるか、あるいはこれらが列挙した特許に記載された結合手と異なるときは、上記の公知の方法を修正して  $X_1$  結合手を導入することにより、当該技術分野における公知の方法により、得ることができる。一般に、B と  $X_1$  との間の結合は、上記で示されたように、エステルまたはアミド型 (X に定義された NH または  $NR_{1c}$ ) である。これらの結合手を形成するための周知の合成経路も、この結合手を形成するのに採用され得る。

エステルの場合、最も直接的な合成経路は次のものを含む：

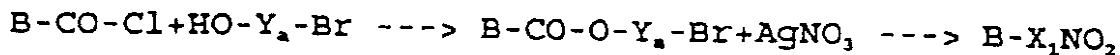
$HO - Y_a - Cl$ 、 $HO - Y_a - Br$ 、 $HO - Y_a - I$  - 型のハロゲンアルコール (ここで、 $Y_a$  は酸素原子を除いて Y または  $Y_1$  に等しい) 中、公知技術に属する試験条件での、アシルクロリド類  $B - CO - Cl$  の反応。

20

式  $B - CO - O - Y - Cl$  ( $Br$ 、 $I$ ) の反応生成物は、塩の酸  $B - CO - OH$  のナトリウムまたはカリウム塩を、一般式  $Y_a Cl_2$ 、 $Y_a Br_a$  または  $Y_a I_2$ 、 $Cl Y_a Br$ 、 $Cl Y_a I$ 、 $Br Y_a I$  のジハロゲン誘導体と反応させることによっても得られる。

反応生成物は、文献で知られている方法に従って、アセトニトリル中で  $AgNO_3$  と反応させることにより、最終生成物に変換され得る。

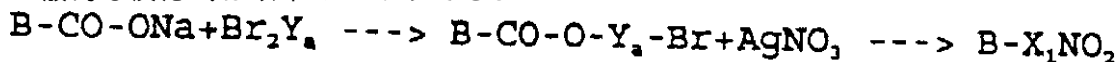
一般的な反応式は次のとおりである：



30

(式中、 $X_1 = Y_a O$ )

一般的な反応式は以下のとおりでもよい：



(式中、 $X_1 = Y_a O$ )

このアミドの場合、合成反応式は、公知の方法に従って、同じアシルクロライド類  $B - CO - Cl$  と一般式  $NH_2 - Y_a - OH$ 、 $NHR_{1c} - Y_a - OH$  のアミノアルコール類を反応させて一般式：

$B - CO - NH - Y_a - OH$  および  $B - CO - NR_{1c} - Y_a - OH$  のアミド類を得る反応を含む。

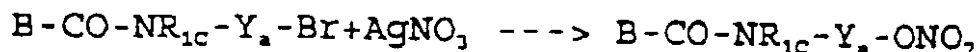
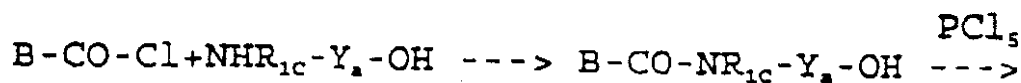
40

これらのアミド類と例えば  $PCl_5$ 、 $PBr_3$ 、 $SOCl_2$  等のハロゲン化剤との反応は、一般式：

$B - CO - NH - Y_a - Br$  ( $Cl$ ) および  $B - CO - NR_{1c} - Y_a - Br$  ( $Cl$ ) のハロゲン誘導体を与える。

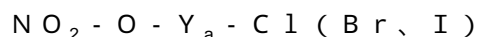
後者は、文献で知られた方法に従って、アセトニトリル中で  $AgNO_3$  と反応させることにより、最終生成物  $BX_1NO_2$  を与える。

この反応式は次のように表される：



(式中、 $Y_aO$ は $X_1$ である)。

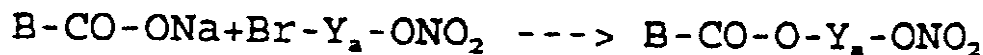
エステル形成への代替的な経路は、酸類のナトリウムまたはカリウム塩類と一般式：



のハロゲンアルコール類の硝酸エステル類との反応により、本発明の物質を直接得るものである。

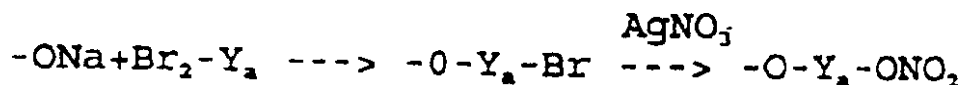
10

この反応式は次のとおりである：



(式中、 $Y_aO$ は $X_1$ である)。

上記の方法に類似の他の合成経路は、ジハロゲン誘導体  $Br_2Y_a$  をエノレート類と反応させる方法を含む。反応生成物は、次いで上記の反応に従って、アセトニトリル中で  $AgNO_3$  と反応させることにより変換される。この一般的な反応式は、 $-CH_2-OH$ 、 $CH=OH$  型の基 B 中の  $-OH$  に対して次のように示される：



20

これらの  $X_1$  結合基を得るための方法は、特許出願 W O 9 5 / 3 0 6 4 1 号に記載されており、この特許出願はここに組み込まれる。

上述のように、式  $B-X_1NO_2$  の本発明の化合物類またはそれらの医薬組成物は、よく知られたコルチコイド製品が用いられている疾病の治療のために使用される。

具体的には、例えば抗喘息剤のような呼吸性の異常における使用、抗関節炎剤、抗搔痒剤、抗乾癬剤、抗湿疹剤としての使用；例えばアンジオスタティックとしての血管障害における使用、例えば免疫抑制剤としての免疫障害における使用が特筆される。

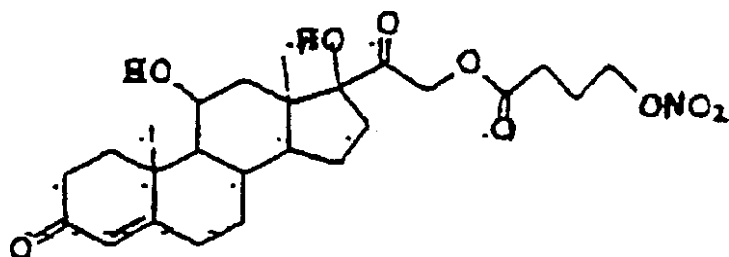
この発明の化合物類、またはそれらの組成物は、例えば経口、直腸（腸の障害）、非経口投与、または局部的（皮膚、局所、経皮、眼、吸入等）投与により適用され得る。

以下の実施例は、一つの説明として例示目的でなされたものであり、本発明を限定するものではない。

30

#### 実施例 1

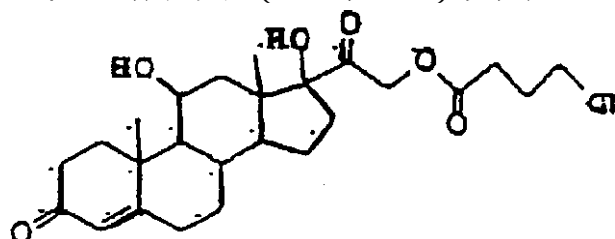
化学合成：ヒドロコルチゾンニトロ誘導体（HCN）の製造



40

#### 実施例 1 A

ヒドロコルチゾン（4-クロロ）ブタノエートの製造



4 部の 4 - クロロブタノイルクロライド（0.32 ml × 4）とトリエチルアミン（0.

50

3 g × 4) を  $\text{CHCl}_3$  中のヒドロコルチゾン (1 g) の溶液に 24 時間で加え、 $\text{P}_2\text{O}_5$  上で乾燥し、3 日間攪拌した。この溶液を水で処理し、有機相を分離し、乾燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) し、減圧下に溶媒を除去した。粗残留物をヘキサンおよび  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で摩砕し、収率 53 重量% で白色固体を得た。これは 155 の融点 (m.p.) を有していた。この生成物を質量分析によりその特性を評価した。

$M^+ 493$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ): 0.95 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.45 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.12 (2H, t,  $\text{CH}_2$  # 2), 2.6 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 3.65 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 4.45 (1H, m,  $\text{CHOH}$ ), 4.35 および 5.05 (2H, 2d,  $\text{COCH}_2\text{O}$ ),

10

5.70 (1H, s, オレフィン H).

ヒドロコルチゾン (4 - ニトロキシ) ブタノエートの製造

$\text{AgNO}_3$  (0.2 g) を、上記で得られたヒドロコルチゾン - 4 クロロブタノエート (0.23 g) のアセトニトリル (70 ml) 溶液に加え、16 時間還流した。溶液から減圧下に溶媒を除去し、溶離剤としてエチルアセテートおよび  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 : 7) の溶液を用いたシリカゲルクロマトグラフィーに付した。

コルチゾン 4 - ニトロキシブタノエートを最初のフラクションから回収した。

この生成物を  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) にてその特性を評価した。

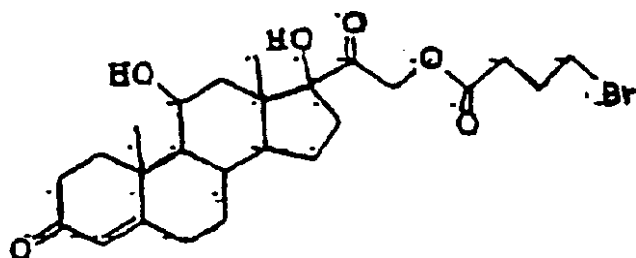
20

0.95 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.45 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.12 (2H, t,  $\text{CH}_2$  # 2), 2.6 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 4.45 (1H, m,  $\text{CHOH}$ ), 4.45 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{O}-\text{NO}_2$ ), 4.35 および 5.05 (2H, 2d,  $\text{COCH}_2\text{O}$ ), 5.68 (1H, s, オレフィン H).

実施例 1 B

実施例 1 A からの生成物を他の合成経路を用いて製造した。

ヒドロコルチゾン 4 - プロモブタノエートの製造



30

5 部の 4 - プロモブタノイルクロライド (0.35 ml × 5) および炭酸カリウム (0.4 g × 5) を、 $\text{CHCl}_3$  中のヒドロコルチゾン (1 g) の溶液に 24 時間で加え、 $\text{P}_2\text{O}_5$  上で乾燥し、5 日間攪拌した。この溶液を水で処理し、有機相を分離し、乾燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) し、減圧下に溶媒を除去した。

ヒドロコルチゾン 4 - ニトロキシブタノエート (HCN) の製造

40

$\text{AgNO}_3$  (0.2 g) を、上記で得られたヒドロコルチゾン 4 - プロモブタノエート (0.23 g) のアセトニトリル (70 ml) 溶液に加え、室温で 48 時間攪拌した。

この溶液から減圧下に溶剤を除去し、溶離剤としてエチルアセテートおよび  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 : 7) の溶液を用いたシリカゲルクロマトグラフィーに付した。

コルチゾン 4 - ニトロキシブタノエートを最初のフラクションから回収し、その特性を質量分析:  $M^+ 493$  により評価した。

そのスペクトルは実施例 1 A で示したものと同一であった。

実施例 2

安全性および活性の評価

*in vivo* テストにおいて、生成物を 2 重量% カルボキシメチルセルロース懸濁液と

50



して投与した。一方、*in vitro*試験では、0.1重量%のジメチルスルホキシド懸濁液を使用した。

試験グループは、十分な統計学的評価のため（実施例において異なる記述のある場合を除いて）、必要に応じて通常の統計学的手法に従って実施されるべき8サンプルを常に含んでいた。

#### 実施例2A

##### 急性毒性試験

1群10匹のスイス系マウスに試験化合物を単回経口投与することにより、実施例1Aからの生成物の急性毒性を大まかに評価した。

死亡発生率および毒性兆候の出現を、化合物投与後14日間にわたり観察した。

動物は、投与量50mg/kgの投与の後でさえ明らかな毒性の兆しを示さなかった。

#### 実施例2B

##### 抗関節炎活性試験

ミネラルオイル0.1ml中に懸濁したミコバクテリウムブチリカム(Difco)0.6mgを体重170±15gのルイス系雄性ラットに尾内注射して、アジュバント関節炎を誘発させた。これらの動物を、ミコバクテリウム接種後の初日から始めて、腹膜組織内(i.p.)のカルボキシメチルセルロースの2重量%水中懸濁液からなる賦形剤で、また投与量5mg/kgまたは10mg/kgのHCN(上記のような懸濁液)の腹膜組織内ヒドロコルチゾンで、処理した。

関節炎の発生をその後21日間評価した。関節炎障害に対して、任意の評点を以下の基準に従って与えた。

- 後ろ足：それぞれに0～7（障害がないのに対して0、最も重篤な障害に対して7）
- 前足：それぞれに0～4.5（障害がないのに対して0、最も重篤な障害に対して4.5）
- 尻尾：0～5（障害がないのに対して0、最も重篤な障害に対して5）
- 耳：それぞれに0～2（障害がないのに対して0、最も重篤な障害に対して2）
- 鼻および目：それぞれに0～1（障害がないのに対して0、最も重篤な障害に対して1）

対照群（媒体だけで処理された動物）で得られた数値と比較した阻止パーセントとして結果を表示した。

その結果を表1に示す。

表1—ラットにおける化合物HCN対ヒドロコルチゾンの抗関節炎活性試験

験

化合物	ドーズ (mg/kg)	抗関節炎活性 (%)
ヒドロコルチゾン	5	40
ヒドロコルチゾン	10	55
HCN	5	45
HCN	10	62

表1の結果に見られるように、試験物質はミコバクテリウムにより引き起こされる関節炎プロセスの進展を同様に抑制することができた。しかしながら、HCNの認容性はヒドロコルチゾンのそれよりも極めて高い（次の実施例2C参照）ので、活性の面からの結果はHCNの場合極めて良好である（比較のため、10mg/kg HCNで得られた62%に関して、5mg/kgのヒドロコルチゾンで得られた抗関節炎活性40%を参照）。

## 実施例 2 C

## 胃の認容性（安全性）試験

24時間絶食させたスプラグ・ドウリー系ラットを、腹膜内のヒドロコルチゾンまたはHCN 5～10 mg/kgで処理した。

24時間後、動物を殺し、胃を取り出し、組織をDeI Soldatoら：“The influence of fasting and cimetidine on the relationship between ulcerogenic and anti-inflammatory properties of cimetidine”、Br.J.Parmacol.67,33-37,1979に記載された障害の存在について全体的に調べた。疾病の重篤度を通常の方法に従って評価し、任意の評点として表わした。その結果を表2に示す。

表2—ラットにおける化合物HCN対ヒドロコルチゾンの胃認容性試験

10

化合物	ドーズ (mg/kg)	胃認容性
ヒドロコルチゾン	5	2.0
ヒドロコルチゾン	10	3.5
HCN	5	0.5*
HCN	10	1.2*

20

次の基準に従った任意の数値としてデータを表示する：0 = なし、1 = 軽微な障害、2 = 中程度の障害、3 = 点状の潰瘍、4 = 激しい多くの潰瘍。\*  $P < 0.05$ （ここで、Pは確率）ヒドロコルチゾンで処理された群における対応数値と比較して。

表2に示されるように、ヒドロコルチゾンで処理されたラットは、粘膜浸食から筋肉層、壁癒着、腹水、腹膜炎を含む潰瘍へ強烈に変化する胃腸管における顕著な疾病を示した。媒体のみまたはHCNで処理された他の群においては、障害は極めて低いか、ほとんどなかった。

## 実施例 2 D

## ニトロキシシンセターゼ活性試験

リポポリサッカライド（LPS）により誘発されるニトロキシシンセターゼ阻害活性を、試験化合物の1つを投与した後のラットの好中球および胃において判定し、懸濁媒体のみで処理して得られた結果と比較した。処理前24時間絶食したウィスター系ラットに、試験化合物の1つを腹腔内に（10 mg/kg）またはLPSを静脈（尾の静脈）に（5 mg/kg）投与した。4時間後に動物を殺した。好中級分離のための血液および胃を採取した。

30

酵素活性をAssreuyら：Feedback inhibition of nitric oxide synthetase activity by nitric oxide, Br.J.Pharmacol.108,833-7,1993に記載の方法に従って測定した。その結果を表3に示す。

表3 ラットにおける化合物HCN対ヒドロコルチゾンのニトロキシシンセターゼ活性の試験

化合物	ドーズ (mg/kg/i.p.)	ニトロキシシンセターゼ活性
媒体	-	100
ヒドロコルチゾン	10	55*
HCN	10	62*

10

<sup>a</sup> 媒体のみで処理された群と比較した阻害%

\* 媒体で処理された群における対応数値と比較した $p < 0.05$ 。

表3で見られるように、媒体のみで処理された群と比較してどちらの試験物質もニトロキシシンセターゼ阻害において極めて有効であることが分かった。

実施例2 E

20

骨の毒性試験

Dohertyらの ( The effect of glucocorticoids on osteoblast function. The effect of corticosterone on osteoblast, expression of beta-1 integrins Journal of Bone and Joint Surgery, Series A 77/3, 396-404, 1995 ) に記載の方法に従って、試験管内で成長させた骨の組織 ( ラット胎仔からの頭頂骨 ) を使用した。ヒドロコルチゾンまたはHCNまたは媒体を  $100 \text{ nmol}$  濃度で一定の温度に保った。

96時間後、カルシウム含量および骨の乾燥重量を測定した。

その結果を表4に示す。

表4 ラットの骨成長に対するHCNおよびヒドロコルチゾンの効果

30

処理	(ナノモル)	カルシウム $\Delta\%$	乾燥組織重量 $\Delta\%$
媒体	-	310	160
ヒドロコルチゾン	10	70*	95*
HCN	10	287	149

40

○初期値との比較 ( 培養時間0 )

\*  $P < 0.05$  対照群 ( 媒体 ) で得られた数値との比較

表4で見られるように、組織の乾燥重量の著しい増加および増加したカルシウムが、媒体またはHCNとともに培養した後に観察された。ヒドロコルチゾンとともに培養した後は、カルシウム含量が減少し、骨の乾燥重量も増えなかった。これは、ヒドロコルチゾンを用いたこの処理が骨の成長に悪い影響を与えたことを示している。

実施例2 F

いくつかの心血管パラメータ試験

Gardinerら : Influence of dexamethasone on the regional haemodynamic responses

50

to lipopolysaccharide in conscious rats: effect of the non-selective endothelin antagonist: SB209670, Br. J. Pharmacology 117, 49p, 1996に記載のようにして、いくつかの心血管パラメーターに対する試験物質の効果を、適当な監視下にある正常なロング・エバンス系ラットで試験した。

動物を媒体（生理食塩水、0.9%塩化ナトリウム、s.c.）、皮下のヒドロコルチゾンまたはHCN（10 mg/kg）で処理した。心拍および血圧を処理後4時間記録した。

表5は、得られたデータをコントロール値からの変動パーセントとして示している。

表5—ラットのいくつかの心血管パラメーターにおけるHCN化合物対

ヒドロコルチゾンの試験

化合物	ドーズ (mg/kg)	心拍 (%)	血圧 <sup>a</sup>
媒体	-	100	160
ヒドロコルチゾン	10	89 <sup>*</sup>	115 <sup>*</sup>
HCN	10	98	103

\*P<0.05媒体で処理された群との比較

<sup>a</sup>媒体単独で処理された群において記録された数値（324±7拍/分）と比較した変化%

<sup>b</sup>媒体単独で処理された群において記録された数値（101±2 mm hg）と比較した変化%

表5の結果は、本発明の物質HCNが測定された心血管パラメーターに影響を与えていないことを示している。反対に、従来技術において用いられているヒドロコルチゾンは、有意な圧力とともに心臓の変化を示している。

実施例2G

ラットにおけるアンジオスタティック活性試験

Andradeら： Quantitative in vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model, Brit. J. Exp. Pathol. 68, 755-766, 1987に記載の方法に従って、体重180～200gのウィスター系雄性ラットを用いた。小さいスポンジを14日間皮下組織に移植し、<sup>133</sup>Xeクリアランスを判定することにより、血流との関連でネオ血管新生を評価した。簡単に言えば、10μlに等しい量の<sup>133</sup>Xeを小さいポリエチレンカニューレを用いてスポンジに注入した。移植後の残留放射能をガンマ線検出器を用いて測定し、6分間の<sup>133</sup>Xeクリアランスを初期値の%として測定した。ネオ血管新生を測定する方法の有効性は、HUら： Correlation of <sup>133</sup>Xe clearance, blood flow and history in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers, Lab. Invest. 72, 601-610, 1995により、最近実証された。

移植後、第1日から第13日にかけて、試験化合物を10 mg/kgの投与量で皮下経路により投与した。皮下移植から第14日に<sup>133</sup>Xeを測定し、動物を殺し、胸腺および脾臓の重量を記録した。

表6は、ネオ血管新生ならびに脾臓および胸腺の重量に対する、試験物質の効果に関して得られたデータを示している。

表6－第14日における $^{133}\text{Xe}$ クリアランスならびに脾臓および胸腺の重量に対するHCNおよびヒドロコルチゾンの効果

測定	$^{133}\text{Xe}$ (%)	脾臓 (mg)	胸腺 (mg)
媒体	42	663±25	313±28
ヒドロコルチゾン	33	642±32	185±17*
HCN	22*	673±38	297±31

10

\* $P < 0.05$  対照群 (媒体) で得られた値と比較して

明らかなように、HCNは、参照物質とは異なって、脾臓および胸腺の重量の変化を伴わないで、顕著なアンジオスタティック効果を発揮できることを証明している。

表1～6に示されたデータの全てから明らかなように、ニトロ誘導体の薬理学的活性 - 抗関節炎、免疫抑制および抗アンジオゲニック活性 - ならびに認容性が、公知技術からのコ

20

#### 実施例3

デキサメタゾン 21 - (4 - プロモブチレート) [ I I ]

デキサメタゾン [ I ] 3.5 g 8.9 ミリモル

4 - プロモブチリルクロライド 4.06 ml 35 ミリモル

炭酸カリウム 4.9 g 35 ミリモル

テトラヒドロフラン 70 ml

化合物 I のテトラヒドロフラン溶液を少しずつ、4 - プロモブチルクロライド (0.81 ml × 5) および炭酸カリウム (0.98 g × 5) で7時間処理する。この混合物を一晩攪拌し、溶媒を減圧下に蒸発させ、残留物をエチルエーテルおよび水で処理する。有機層を分離し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。溶媒を蒸発させた後、残留物を t . ブチルメチルエーテル - ヘキサン 1 - 1 で溶出するシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製して：

30

- 極性の低い化合物 1.0 g

- 誘導体 I I 1.5 g (m . p . 184 - 187 ; 収率 31 %)

TLC : t . ブチルメチルエーテル - ヘキサン 2 - 1。

デキサメタゾン 21 - (4 - ニトロオキシブチレート) [ I I I ] (化合物 D X N)

化合物 I I 1.5 g 2.7 ミリモル

硝酸銀 2.4 g 14.1 ミリモル

アセトニトリル 250 ml

40

アセトニトリル中の化合物 I I および硝酸銀の混合物を7時間加熱還流する。無機の塩を濾過した後、溶媒を減圧下に蒸発させ、残留物をエチルエーテルで処理する。有機層を水で2回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下に蒸発させる。残留物をエチルエーテル中に注ぎ、濾過して、白色固体として純粋な化合物 I I I 1.27 g を得る (m . p . 183 - 185 ; 収率 90 %)

TLC : t . ブチルメチルエーテル - ヘキサン 2 - 1。

次のフォームが納められている：

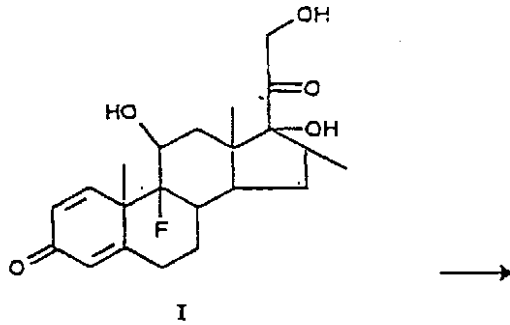
- 合成式；

- NCX 1005 バッチ 1；

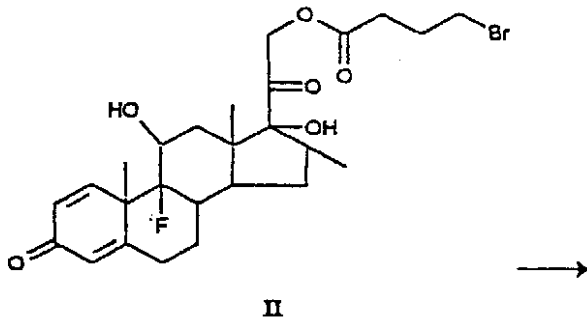
- NCX 1005 / 1 分析。

50

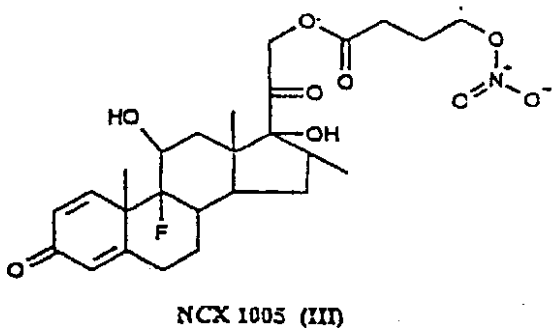
デキサメタゾン 21 - ( 4 - ニトロオキシブチレート ) 製造のための合成式



10



20



30

#### 実施例 4

##### 白血球の蓄積に対する活性試験

標準的なペレット状の餌および随意の飲み水で維持されたスイス系白変種雄性マウス ( 27 - 33 g ) を使用した。Perrettiら ( Perretti M., Solito E., Parente L., Evidence that endogenous interleukin-1 is involved in neutrophil migration in acute experimental inflammation in rats and mice , Agents Actions, 35, 71, 1992 ) に既に記載されているようにして、実験を行った。動物をザイモサン ( 1 mg / 0.5 ml ) i . p . で0時に前処理した。2時間後、デキサメタゾン ( 1 mg / kg ) ( E x 3 - I )、DXN ( E x 3 - I I I ) ( 1 mg / kg ) またはホスフェートで緩衝された食塩水 ( P B S ) を静脈内に投与した。4時間後および24時間後に動物を殺し、洗浄液を集め、ディフ

40

アレナシャル・セル・カウントを行い、Turk'sで着色した。  
表7は、マウスにおけるザイモサン - 誘発白血球遊走に対する試験化合物の抑制効果について得られた結果を報告している。見られるように、ニトロ誘導体ステロイドはデキサメタゾンよりはるかに活性である。

表7ーザイモサン (1mg/0.5ml) i. p. 2時間後に i. v. 投与されたデキサメタゾンおよびDXN (1mg/kg) による好中球および単球の漸増の抑制

測定	PMN $\times 10^6$ /マウス (時間 4h)	% 減少率	モノ- $\text{m}\phi$ $\times 10^6$ /マウス (時間 24h)	% 減少率
総体	10.1 $\pm$ 1.0	.....	8.8 $\pm$ 1.3	.....
DXN	4.5 $\pm$ 0.3	55.4	4.5 $\pm$ 0.6	48.8
デキサメタゾン	6.4 $\pm$ 0.4	36.6	6.3 $\pm$ 0.2	28.4

10

#### 実施例 5

ヒトの気道平滑筋細胞における抗増殖活性試験

ヒトの気道平滑筋細胞を標準的な組織移植方法により培養した。PBSおよびペニシリンおよびストレプトマイシンを入れた滅菌ポットに組織を集めた。滅菌組織培養条件の下に、組織を小片に切断し(重量約1mg)、20%仔牛血清(FCS)を含む標準的な培地中に数日間(2-4日ごとに培地を変える)置く。 $^3\text{H}$ -チミジンを、48のウェル・プレート中で培養された細胞のDNAフラクション中で測定した。細胞を10%FCS含有培地中で培養して密集させた。異なった濃度のステロイド類と共に10%FCSを加える24時間前に、細胞から血清を取り去った。24時間後、細胞に $^3\text{H}$ -チミジンを4時間加えた。細胞をフォスフェートで緩衝された食塩水およびエタノールで洗浄した。DNAを水酸化ナトリウム溶液で抽出し、 $^3\text{H}$ 物質をシンチレーションにより数えた。データは、健康な肺のドナーから培養された平滑筋からの、3倍のウェルにおいて行われた観察を表わす。表8は、ヒトの気道平滑筋細胞増殖に対する試験化合物の抑制効果について得られた結果を報告している。見られるように、ニトロ誘導体ステロイドはデキサメタゾンよりはるかに活性が強い。

20

表8ー異なった濃度のデキサメタゾンおよびDXNによるヒトの気道平

30

滑細胞の有糸分裂生起の抑制

処理	濃度 (logM)	$^3\text{H}$ -チミジン (CPM $\times 1000$ )
デキサメタゾン	-5	14.1
	-7	15.0
DXN	-5	10.8
	-7	12.6

40

#### 結論

上記に報告された結果から見られるように、新規なニトロ誘導体の活性および安全性は、前駆体ステロイド類の有するそれらよりも優れている。

---

フロントページの続き

(72)発明者 デル ソルダト、ピエロ  
イタリア、アイ 20052 モンザ、ヴィア トティ 22

審査官 齋藤 恵

(56)参考文献 米国特許第3494941(US, A)  
特公昭53-30707(JP, B2)  
特開昭50-157353(JP, A)  
国際公開第97/34871(WO, A1)  
西独国特許出願公開第1643034(DE, A)  
米国特許第3183252(US, A)  
米国特許第3172896(US, A)  
米国特許第2990401(US, A)  
特開昭52-33664(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07J 41/00  
A61K 31/00 - 573  
CA/REGISTRY(STN)