

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5826750号  
(P5826750)

(45) 発行日 平成27年12月2日(2015.12.2)

(24) 登録日 平成27年10月23日(2015.10.23)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/58	(2006.01)
A 61 P 29/00	(2006.01)
A 61 P 11/06	(2006.01)
A 61 P 11/00	(2006.01)
A 61 P 27/02	(2006.01)
A 61 K	31/58
A 61 P	29/00
A 61 P	11/06
A 61 P	11/00
A 61 P	27/02

請求項の数 5 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-528448 (P2012-528448)
(86) (22) 出願日	平成22年9月13日(2010.9.13)
(65) 公表番号	特表2013-504551 (P2013-504551A)
(43) 公表日	平成25年2月7日(2013.2.7)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2010/001727
(87) 國際公開番号	W02011/030116
(87) 國際公開日	平成23年3月17日(2011.3.17)
審査請求日	平成25年9月13日(2013.9.13)
(31) 優先権主張番号	0916020.1
(32) 優先日	平成21年9月11日(2009.9.11)
(33) 優先権主張国	英國(GB)
(31) 優先権主張番号	1009342.5
(32) 優先日	平成22年6月3日(2010.6.3)
(33) 優先権主張国	英國(GB)

(73) 特許権者	512063195 バイオネイチャー イー. エイ. リミテッド.
	キプロス ニコシア 1090 デメトラ コポウロウ ストリート 2
(74) 代理人	110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(72) 発明者	パノウトサコボウロウ, ヴァシリキ ギリシャ共和国 ジーアール-190 O 2 アテネ, サイマリオン ストリート 39, パイアニア
(72) 発明者	アンジェラコボウロウ, マリア ギリシャ共和国 ジーアール-115 2 5 アテネ, ネオ サイチコ, フラグ コポウロウ ストリート, 31-33 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】炎症性疾患および自己免疫疾患へのステロイド化合物の使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

17 -スピロ- [ 5-アンドロステン-17 , 2'-オキシラン ] -3 -オール ; (20S)-3 , 2  
1-ジヒドロキシ-17 , 20-エポキシ-5-ブレグネン ; および3 , 21-ジヒドロキシ-17 ,  
20-エポキシ-5-ブレグネンからなる群から選択される化合物またはそれらの薬学的に許容  
されるエステル、塩もしくは酸付加塩を有効成分として含有する炎症性疾患の予防または  
治療用医薬であり、前記疾患が、喘息、肺炎症、網膜炎症疾患および自己免疫疾患からな  
る群から選択される医薬。

## 【請求項 2】

前記自己免疫疾患が、関節リウマチ、I型糖尿病、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大  
腸炎、炎症性腸疾患または筋疾患である、請求項1に記載の医薬。 10

## 【請求項 3】

前記自己免疫疾患が、重症筋無力症、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血、難治性  
強皮症、皮膚炎、後天性天疱瘡、バセドウ病、自己免疫肝炎、乾癬またはクローン病であ  
る、請求項1に記載の医薬。

## 【請求項 4】

請求項1で定義される化合物、またはその薬学的に許容されるエステル、塩もしくは酸  
付加塩を有効成分として含有する、ヒトまたは非ヒト動物体の免疫学的応答を制御または  
抑制するための薬剤。

## 【請求項 5】

請求項 1 で定義される化合物、またはその薬学的に許容されるエステル、塩もしくは酸付加塩を有効成分として含有する、ヒトまたは非ヒト動物体内での T 細胞活性を制御または抑制するための薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、炎症性疾患、例えば、喘息の症状の治療、予防または改善における、スピロステロイドアナログを含むステロイド化合物の使用に関する。免疫系に対する作用機構は、ステロイド化合物が、喘息、肺炎症、網膜炎症疾患、自己免疫疾患、たとえば関節リウマチ、多発性硬化症および全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患ならびに筋疾患を包含するが、これらに限定されない様々な炎症性疾患を治療するために有用であることを示す。  
10

【背景技術】

【0002】

炎症は、種々の侵害刺激および状態により引き起こされる適応応答である。炎症は、白血球および血漿タンパク質の患部組織部位への動員を誘発する。炎症は、免疫系と関連した多くのヒト疾患の根底にある。炎症性疾患のリストは拡大し続け、当初は炎症ではなく変性であると考えられた一般的な疾患も含むようになっている。炎症は、外因性（外因性炎症関連疾患を引き起こす（感染、アレルゲン、薬物暴露、薬物、化学物質、喫煙、公害、グルテン、コレステロール、グルコース））および内因性（自己炎症と自己免疫炎症）に分類される。自己炎症性疾患（FMF、HIDS、TRAPS）は先天性免疫の疾患であり、一方、自己免疫疾患（全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性硬化症、重症筋無力症、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血、難治性強皮症、皮膚炎、後天性天疱瘡、バセドウ病、自己免疫肝炎、乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎）は、先天性および獲得免疫の疾患である。  
20

【0003】

病原体に対する免疫は、抗原特異性Tヘルパー（Th）リンパ球Th1、Th2およびTh17の誘導を介してもたらされる。Th1免疫は、細胞内病原体から防御し、過剰である場合、自己免疫に至る可能性がある。異常なTh1-およびTh17-細胞活性化は自己免疫に至る可能性があり、一方、環境抗原に対する過剰なTh2-細胞活性化は、アレルギーや喘息を誘導する可能性がある。Th1細胞はIFN- $\gamma$ を產生し、マクロファージを活性化して、細胞内病原体と闘う。Th2細胞は、肥満細胞および好酸球を刺激するIL-4、IL-5およびIL-13などのサイトカインを产生し、B細胞によるIgE产生を増強する。Th17細胞は、真菌および細菌などの病原体に対する先天性および獲得免疫応答を調整する。異なるT細胞サブセット、T調節性細胞（Treg）は、過剰増殖性Th1、Th2またはTh17細胞による免疫病理を制限する。Th免疫の活性化および分化は、樹状細胞（DC）などの抗原提示細胞とTh細胞の相互作用に依存し、サイトカインはこのプロセスで重要な役割を果たす。  
30

【0004】

過剰増殖性Th1、Th2またはTh17免疫応答は、抑制（免疫抑制）機構によって制限される。これらの機構には、TGF- $\beta$ などのサイトカインの局所的分泌ならびにエフェクターT細胞上のCD80およびCD86分子に対するサプレッサーT細胞上のCTLA-4などの細胞表面分子の結合による直接的細胞接触が含まれる。抑制は、異なる組織におけるサプレッサーおよびエフェクターT細胞の適切な共局在を必要とし、エフェクター細胞機能の調節に重要な転写因子を誘発するT細胞受容体シグナリングの妨害を伴う可能性がある。Treg細胞は、重要なサプレッサー活性を示す。Treg細胞は、自己抗原に対する免疫不応答の維持および宿主に対して有害な過剰免疫応答の抑制に不可欠な役割を果たす。Tregは胸腺でT細胞の機能的に成熟した亜集団として產生され、また末梢でナイーブT細胞から誘導される可能性もある。最近の研究で、Treg発生および機能の細胞および分子的基盤が明らかになり、Tregの調節不全が免疫疾患に関係しているとされる。  
40

【0005】

10

20

30

40

50

内因性ステロイドであるグルココルチコイドは、おそらくは最も強力な抗炎症薬の1つであるが、これらの薬物は多くの望ましくない副作用（例えば、中枢性肥満、高血糖、骨粗鬆症）を有する可能性があり、それらの使用は厳密に制御されなければならない。

#### 【 0 0 0 6 】

5-アンドロステン-16 -フルオロ-17-オン (HE2500) などのデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) の合成誘導体およびいくつかの天然の代謝物は、自己免疫および代謝性疾患の種々の動物モデルにおいて有益であることが示されている。しかし、DHEAのように、これらの化合物の低い効力および低い経口バイオアベイラビリティーは、ヒトにおける有用性が限られていることを示唆していた。DHEAの新規17-エチニル誘導体であるHE3286は、マウスおよびコラーゲンによって誘導された関節炎 (CIA) のDBAマウスモデルでは最高25 %までの経口バイオアベイラビリティーを示し；HE3286 (50mg / kg) での経口治療（疾患発症時に開始）を受けている動物は、著しく減少したCIAピークスコアおよび関節炎スコアの日重症度 (daily severity) を示した。HE3286は、マイトジエンで誘導された増殖、遅延型過敏反応、または混合リンパ球反応など、試験した古典的モデルのいずれにおいても免疫抑制性であることは見出されなかった。その代わりに、その効力は、CD4+CD25+FOX p3+CD127-調節性T細胞 (Treg) の数および機能の増加と関連していた。10

#### 【 0 0 0 7 】

炎症性疾患の新規な治療の開発が引き続き求められている。DHEAなどの天然のニューロステロイドは、実験動物において重要な免疫抑制特性を有する。しかしながら、天然由来のニューロステロイドは、ヒトでは、ホルモン依存性腫瘍など、全身性の重大な内分泌副作用を発現する、エストロゲン、アンドロゲンまたはプロゲスチンに代謝され(Front Neuroendocrinol 21, 1 (2000))、したがって、臨床での使用が制限されている。20

#### 【 0 0 0 8 】

US3,365,475号 (1968年) には、17 - (3'-ヒドロキシ-プロピル) -4-アンドロステン-3 , 17 -ジオールの調製方法が開示されている。この化合物はアルドステロン阻害剤として有用な治療特性を有するステロイド17-スピロテトラヒドロフランの調製に役立つ。

#### 【 0 0 0 9 】

US4,026,918号 (1977年) には、抗炎症性活性を持つとされるいくつかのD-ホモステロイドの調製が記載されている。化学中間体として(3 , 11 , 17 ) -スピロ [ アンドロスト-5-エン-17 , 2'-オキシラン ] -3 , 11 -ジオールが開示されている。30

#### 【 0 0 1 0 】

US4,054,563号 (1977年) には、アルドステロンアンタゴニスト調製の中間体として有用とされている、17-スピロ - (2'-オキサシクロペンタン) ステロイド化合物の製造方法が開示されている。

#### 【 0 0 1 1 】

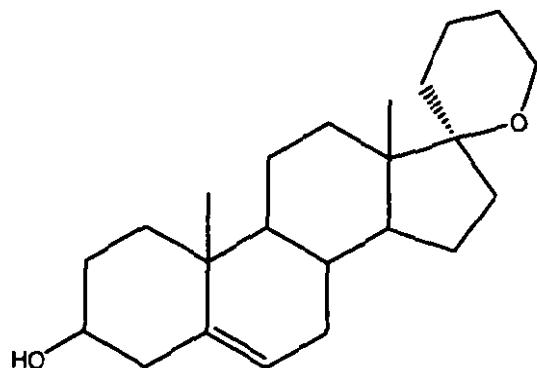
W098/33506号には、前立腺癌および良性の前立腺肥大の治療に有用とされる、アンドロゲン合成を阻害するいくつかの化合物の使用が開示されている。記載されている類似化合物の1つに17 , 20 -アジリジニル-プレゲン-5-エン-3 -オールがある。

#### 【 0 0 1 2 】

Journal of Medicinal Chemistry 10(4), 546-551 (1967) には、抗エストロゲン特性を持つステロイド化合物を調製する際の中間体として下記式Bのステロイド環状エーテルが言及されている。40

#### 【 0 0 1 3 】

【化1】

**B**

【0014】

WO2008 / 155534号は、ニューロステロイド化合物、ならびに、アルツハイマー病およびパーキンソン病を含む、神経死または神経損傷に関連した神経変性疾患の治療におけるその使用を開示している。

20

【発明の概要】

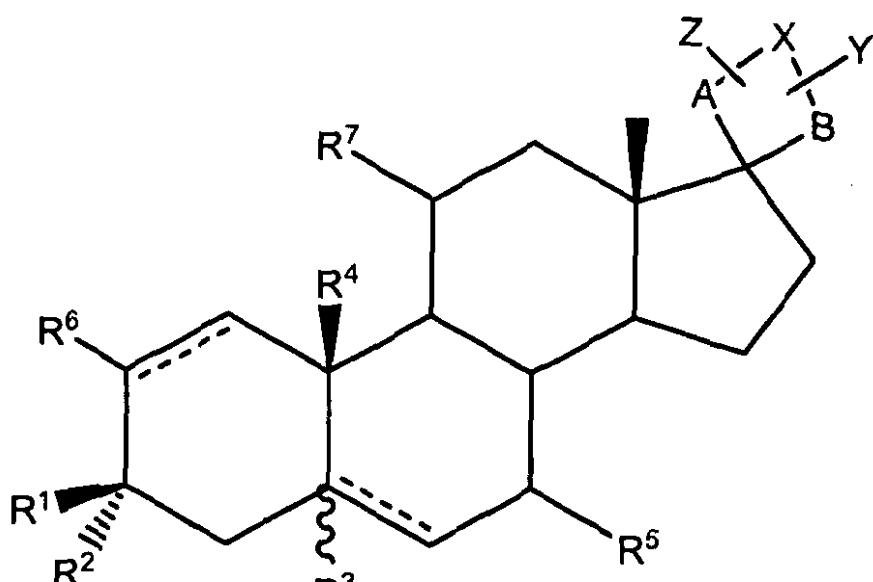
【0015】

第1の態様では、本発明は、炎症性疾患を予防または治療する方法であって、有効量の式Iの化合物：

20

【0016】

【化2】



(I)

【0017】

(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、A、B、X、YおよびZは以下の詳細な説明で定義するとおりである)、またはその薬学的に許容されるエステル、塩もしくは酸付加塩を患者

40

50

に投与することを含む方法に関する。

【0018】

前記炎症性疾患は、ほんの一例であるが、喘息、肺炎症、網膜炎症疾患、自己免疫疾患、例えば、関節リウマチ、I型糖尿病、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血、難治性強皮症、皮膚炎、後天性天疱瘡、バセドウ病、自己免疫肝炎、乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎および炎症性腸疾患ならびに筋疾患のいずれかであり得る。多発性硬化症は、本発明により治療可能な別の疾患である。

【0019】

別の態様において、本発明は、炎症性疾患の予防または治療において用いられる、式Iの化合物、またはその薬学的に許容されるエステル、塩もしくは酸付加塩に関する。前記疾患は、たとえば、前述のもののいずれかであり得る。10

【0020】

別の態様において、本発明は、炎症性疾患の予防または治療用医薬の製造のための式Iの化合物、またはその薬学的に許容されるエステル、塩もしくは酸付加塩の使用に関する。前記疾患は、たとえば、前述のもののいずれかであり得る。

【0021】

別の態様において、本発明は、ヒトまたは非ヒト動物体の免疫学的応答を制御または抑制するための、式Iの化合物、またはその薬学的に許容されるエステル、塩もしくは酸付加塩の使用に関する。20

【0022】

別の態様において、本発明は、ヒトまたは非ヒト動物体内でのT細胞活性を制御または抑制するための、式Iの化合物、またはその薬学的に許容されるエステル、塩もしくは酸付加塩の使用に関する。

【0023】

説明および具体的な実施形態で記載し、例示されるような、項目および所望の特徴、特性、特質、ならびに要素およびプロセスステップの互いの関係の以下の詳細な説明から本発明をよりよく理解できるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、実験的研究において、刺激された培養マウスリンパ節細胞に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。30

【図2】図2は、ある予備刺激されていない精製培養マウスCD4<sup>+</sup>T細胞に対するいくつかのステロイド化合物の効果(図2a)、ならびにIL-2およびIFN- $\gamma$ の増殖および分泌に対するそれらの効果(それぞれ図2bおよび2c)を示す棒グラフの形態の実験的研究結果を含む。

【図3】図3は、実験的研究において、刺激された培養マウス精製CD4<sup>+</sup>T細胞に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図4】図4は、実験的研究において、フローサイトメトリー分析後の培養物におけるCD4<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>細胞の数に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図5】いくつかのステロイド化合物の、MOGペプチドで誘導された実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)から防御する能力を調査するための実験プロトコルのタイムラインを概略的に示す。40

【図6】図6は、図5に示されるプロトコルにしたがった実験的研究において、いくつかのステロイド化合物のマウスの平均臨床EAEスコアに対する経時的效果を示すグラフである。

【図7】図7は、EAE疾患の発症率(図7a)、平均最大臨床スコア(図7b)および疾患の発症日(図7c)について、いくつかのステロイド化合物のマウスに対する効果を示す棒グラフの形態の、図5に示されたプロトコルにしたがった実験的研究の結果を含む。

【図8】図8は、図5に示されるプロトコルにしたがった実験的研究において、マウスの脊髄における炎症に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す染色切片を含む。

【図9】図9は、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する細胞増殖(図9a)、IFN- $\gamma$ およびIL-10の産生50

量（図9bおよび9c）、サイトカインIL-17の分泌（図9d）ならびにIFN- $\gamma$ /IL-17比（図9e）に関して、EAEを発症するように誘導されたあるマウスのリンパ節細胞に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフの形態の実験的研究の結果を含む。

【図10】図10は、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の発症後のいくつかのステロイド化合物の防御効果を調査するための実験プロトコルのタイムラインを概略的に示す。

【図11】図11は、図10に示されるプロトコルにしたがった実験的研究において、マウスの平均臨床EAEスコアに対するいくつかのステロイド化合物の経時的効果を示すグラフである。

【図12】図12は、図10に示されるプロトコルにしたがった実験的研究において、平均最大臨床スコアに関して、マウスに対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。10

【図13】図13は、IL-10の産生量（図13a）、ならびにIFN- $\gamma$ （図13b）およびサイトカインIL-17（図13c）の分泌に関して、EAEを発症するように誘導されたあるマウスのリンパ節細胞に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフの形態の実験的研究結果を含む。

【図14】図14は、気管支肺胞洗浄（図14a）、肺白血球浸潤（図14b）およびOVA特異的T細胞増殖（図14c）における異なる種類の白血球の数に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフの形態の、特定のマウスの実験的研究結果を含む。

【図15】図15は、いくつかのステロイド化合物の、確立されたMOGペプチドで誘導された実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を抑制する能力を調査するための実験的プロトコルのタイムラインを概略的に示す。20

【図16】図16は、図15に示されるプロトコルにしたがった実験的研究において、マウスの平均臨床EAEスコアに対するいくつかのステロイド化合物の経時的効果を示すグラフである。

【図17】図17は、図15に示されるプロトコルにしたがった実験的研究において、平均最大臨床スコアに関して、いくつかのステロイド化合物のマウスに対する効果を示す棒グラフである。

【図18】図18は、図15に示されるプロトコルにしたがった実験的研究において、マウスの脊髄における炎症に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す染色切片を含む。

【図19】図19は、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する細胞増殖（図19a）、IFN- $\gamma$ およびIL-17の産生量（図19bおよび19c）、ならびにサイトカインIL-10の分泌（図19d）に関して、EAEを発症するように誘導されたあるマウスのリンパ節細胞に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフの形態の実験的研究結果を含む。30

【図20】図20は、実験的研究において、フローサイトメトリー分析後の培養物中のCD3 $^+$ CD4 $^+$ IL10 $^+$ T細胞の数に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図21】図21は、実験的研究において、マウスの平均臨床EAEスコアに対するいくつかのステロイド化合物の経時的効果を示すグラフである。

【図22】図22は、実験的研究において、平均最大臨床スコアに関して、マウスに対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図23】図23は、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する細胞増殖（図23a）ならびに產生されたIFN- $\gamma$ およびIL-17の量（図23bおよび23c）に関して、EAEを発症するように誘導された特定のマウスのリンパ節細胞に対するあるステロイド化合物の効果を示す棒グラフの形態の実験的研究結果を含む。40

【図24】図24は、実験的研究において、マウスの平均臨床EAEスコアに対するいくつかのステロイド化合物の経時的効果を示すグラフである。

【図25】図25は、実験的研究において、平均最大臨床スコアに関して、マウスに対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図26】図26は、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する細胞増殖（図26a）ならびに產生されたIFN- $\gamma$ およびIL-17の量（図26bおよび26c）に関して、EAEを発症するように誘導された特定のマウスのリンパ節細胞に対するあるステロイド化合物の効果を示す棒グラフの形態の実50

験的研究結果を含む。

【図27】図27は、実験的研究において、フローサイトメトリー分析後の培養物におけるCD11c<sup>+</sup>細胞（図27a）、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>T細胞（図27b）およびCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞の数に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフの形態の実験的研究結果を含む。

【図28】図28は、実験的研究において、マウスの平均臨床EAEスコアに対するいくつかのステロイド化合物の経時的効果を示すグラフである。

【図29】図29は、実験的研究において、平均最大臨床スコアに関して、マウスに対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図30】図30は、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する細胞増殖に関して、EAEを発症するように誘導されたあるマウスのリンパ節細胞に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。  
10

【図31】図31は、実験的研究において、マウスの平均臨床EAEスコアに対するいくつかのステロイド化合物の経時的効果を示すグラフである。

【図32】図32は、実験的研究において、平均最大臨床スコアに関して、マウスに対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図33】図33は、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する細胞増殖（図33a）ならびに産生されたIFN- $\gamma$ およびIL-17の量（図33bおよび33c）に関して、EAEを発症するように誘導された特定のマウスのリンパ節細胞に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフの形態の実験的研究結果を含む。

【図34】図34は、実験的研究において、マウスの平均臨床EAEスコアに対するあるステロイド化合物の経時的効果を示すグラフである。  
20

【図35】図35は、実験的研究において、平均最大臨床スコアに関して、マウスに対するあるステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図36】図36は、実験的研究において、フローサイトメトリー分析後の培養物におけるCD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞の数に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図37】図37は、実験的研究において、フローサイトメトリー分析後の培養物において、CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>細胞の数に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。  
。

【図38】図38は、フローサイトメトリーによって得られ、実験的研究において、培養物におけるCD25およびFoxp3<sup>+</sup>細胞の数に対するいくつかのステロイド化合物の効果を示す出力図を含む。  
30

【図39】図39は、実験的研究において、培養されたナイーブCD4<sup>+</sup>細胞に対するあるステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【図40】図40は、まずEAEを発症するように誘導され、ステロイド化合物で治療され、次いでOVA/CFA（完全フロイントアジュvant）で免疫化されたあるマウスのリンパ節細胞に対するあるステロイド化合物の効果を示す棒グラフである。

【0025】

図面のさらに詳細な考察を、下記実施例1～8に記載する。

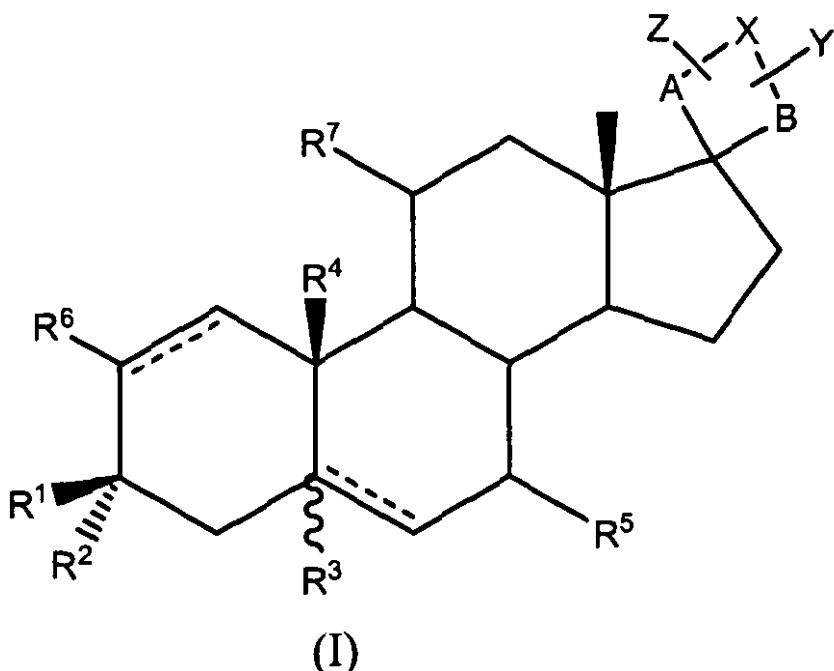
【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、式Iの化合物の使用に関する。  
40

【0027】

【化3】



【0028】

式中、

$R^1$ はヒドロキシル、アルコキシ、アルカノイルオキシ、アミノカルボニルオキシまたはアルコキカルボニルオキシであり；

$R^2$ は水素、任意に置換されているアルキル、任意に置換されているアルケニル、任意に置換されているアルコキシアルキル、任意に置換されているアミノアルキル、シアノ、任意に置換されているシアノアルキル、任意に置換されているチオシアノアルキル、イソチオシアノ、任意に置換されているアジドアルキル、任意に置換されているアルカノイルオキシアルキル、任意に置換されているアリールアルキル、任意に置換されているヘテロアリールアルキル、任意に置換されているアリールアルケニル、任意に置換されているヘテロアリールアルケニル、任意に置換されているアリール、任意に置換されているアリールキニル、任意に置換されているアリールキルアルキニル、任意に置換されているアルカノイルオキシアルキニル、任意に置換されているヘテロアリールオキシアルキニル、任意に置換されているオキソアルキニルまたはそのケタール、任意に置換されているシアノアルキニル、任意に置換されているヘテロアリールアルキニル、任意に置換されているヒドロキシアルキニル、任意に置換されているアルコキシアルキニル、任意に置換されているアミノアルキニル、任意に置換されているアシルアミノアルキニル、任意に置換されているメルカプトアルキニル、任意に置換されているヒドロキシアルキニル二酸ヘミエステルもしくはその塩、または任意に置換されているアルキニルオキシアルキニルであり；

あるいは

$R^1$ は酸素であり、 $R^2$ は $R^1$ に結合したアルキル基またはアルケニル基またはアルキニル基であり、任意に置換されていてもよい含酸素環を形成し；

$R^3$ は水素であるか、あるいは、ステロイド環系のC5とC6の間に二重結合が存在する場合、 $R^3$ は存在せず；

$R^4$ は水素または低級アルキルであり；

$R^5$ は水素、アミノ、任意に置換されているアルキルアミノ、任意に置換されているジアルキルアミノ、任意に置換されているアルケニルアミノ、任意に置換されているジアルケニルアミノ、任意に置換されているアルキニルアミノ、任意に置換されているジアルキニルアミノ、アミド、チオ、スルフィニル、スルホニル、スルホニアミド、ハロゲン、ヒド

30

40

50

40

50

ロキシル、任意に置換されているアルコキシ、任意に置換されているアルケニルオキシ、任意に置換されているアルキニルオキシアルキル、任意に置換されているアルケニル、任意に置換されているアルキニル、任意に置換されているアリール、アジド、任意に置換されているヘテロアリール、オキシム=N-O-R<sup>8</sup>、カルボキシメチルオキシム、カルボキシエチルオキシムまたはカルボキシプロピルオキシムであり；

R<sup>6</sup>は水素、アミノ、チオ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ハロゲン、ヒドロキシル、任意に置換されているアルコキシ、任意に置換されているアルキル、任意に置換されているアルケニルまたは任意に置換されているアルキニルであり；

R<sup>7</sup>は水素、アミノ、任意に置換されているアルキルアミノ、任意に置換されているジアルキルアミノ、任意に置換されているアルケニルアミノ、任意に置換されているジアルケニルアミノ、任意に置換されているアルキニルアミノ、任意に置換されているジアルキニルアミノ、アミド、チオ、スルフィニル、スルホニル、スルホンアミド、ハロゲン、ヒドロキシル、任意に置換されているアルコキシ、任意に置換されているアルケニルオキシ、任意に置換されているアルキニルオキシアルキル、任意に置換されているアルケニル、任意に置換されているアルキニル、任意に置換されているアリール、アジド、任意に置換されているヘテロアリール、オキシム=N-O-R<sup>8</sup>、カルボキシメチルオキシム、カルボキシエチルオキシムまたはカルボキシプロピルオキシムであり；

Xは原子価結合、メチレン基(-CH<sub>2</sub>-)または酸素、硫黄から選択されるヘテロ原子、または-NH、-S(O)、-SO<sub>2</sub>、-NR<sup>8</sup>、-NC(O)R<sup>8</sup>、-N-トルエン-4-スルホニルオキシであり；

Aは-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、C<sub>2-5</sub>アルケニレン基またはC<sub>2-5</sub>アルキニレン基であり、nは整数であり、0または1または2または3または4または5の値をとることができ；

Bは-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-、C<sub>2-5</sub>アルケニレン基またはC<sub>2-5</sub>アルキニレン基であり、yは整数であり、1または2または3または4または5の値をとることができ；

Yは、ステロイド骨格のC17のスピロ環置換基の任意の炭素に結合してもよく、独立にH、任意に置換されているC<sub>1-10</sub>アルキル、任意に置換されている縮合二環式環系、任意に置換されている架橋二環式環系、任意に置換されている架橋三環式環系、任意に置換されているC<sub>2-10</sub>アルケニル、任意に置換されているC<sub>2-10</sub>アルキニル、任意に置換されているアリール、任意に置換されているアリールアルキル、任意に置換されているヘテロアリール、任意に置換されているヘテロアリールアルキル、ホルミル、カルボキシ、-NC(O)R<sup>8</sup>、NC(S)R<sup>8</sup>、-NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>、任意に置換されているC(O)-W、任意に置換されているC(O)O-W、または任意に置換されているC(S)O-Wであり；

Zは、ステロイド骨格のC17のスピロ環置換基の任意の炭素に結合してもよく、独立にH、任意に置換されているC<sub>1-10</sub>アルキル、任意に置換されている縮合二環式環系、任意に置換されている架橋二環式環系、任意に置換されている架橋三環式環系、任意に置換されているC<sub>2-10</sub>アルケニル、任意に置換されているC<sub>2-10</sub>アルキニル、任意に置換されているアリール、任意に置換されているアリールアルキル、任意に置換されているヘテロアリール、任意に置換されているヘテロアリールアルキル、ホルミル、カルボキシ、-NC(O)R<sup>8</sup>、NC(S)R<sup>8</sup>、-NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>、任意に置換されているC(O)-W、任意に置換されているC(O)O-W、任意に置換されているC(S)O-Wであり；

YおよびZは、C17のスピロ環置換基の同じ炭素に結合してもよく

Wは、任意に置換されているC<sub>1-10</sub>アルキル、任意に置換されているヘテロシクロアルキル、任意に置換されている縮合二環式環系、任意に置換されている架橋二環式環系、任意に置換されている架橋三環式環系、任意に置換されているC<sub>2-10</sub>アルケニル、任意に置換されているヘテロシクロアルケニル、任意に置換されているC<sub>2-10</sub>アルキニル、任意に置換されているヘテロシクロアルキニル、任意に置換されているアリールまたは任意に置換されているヘテロアリールであり；

R<sup>8</sup>およびR<sup>9</sup>は独立に、任意に置換されているC<sub>1-10</sub>アルキル、任意に置換されているヘテロシクロアルキル、任意に置換されている縮合二環式環系、任意に置換されている架橋二環式環系、任意に置換されている架橋三環式環系、任意に置換されているC<sub>2-10</sub>アルケニル、任意に置換されているヘテロシクロアケニル、任意に置換されているC<sub>2-10</sub>アルキ

ニル、任意に置換されているヘテロシクロアルキニル、任意に置換されているアリールまたは任意に置換されているヘテロアリールであり；および、

点線は、単結合または二重結合が存在していてよいことを示す。

#### 【0029】

式Iの化合物およびそれらの薬学的に許容されるエスエル、塩または酸付加塩は、炎症性疾患、特に免疫系に関連するものの症状を治療、予防または改善するために使用することができる。治療可能な疾患としては、ほんの一例であるが、喘息、肺炎症、網膜炎症疾患、自己免疫疾患、たとえば関節リウマチ、I型糖尿病、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血、難治性強皮症、皮膚炎、後天性天疱瘡、バセドウ病、自己免疫肝炎、乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎および炎症性腸疾患ならびに筋疾患が挙げられる。多発性硬化症は、本発明にしたがって治療することができる別の疾患である。10

#### 【0030】

本発明の実施形態は、上記の式I中、Xがメチレン基、酸素原子または-NHであることが好ましい。より好ましくは、Xは酸素原子である。

#### 【0031】

また、本発明の実施形態は、上記の式I中、ステロイド環系のC5とC6の間に二重結合が存在し、R<sup>3</sup>が存在しないことが好ましい。

#### 【0032】

さらに、本発明の実施形態は、上記の式I中、R<sup>1</sup>=OHであり；R<sup>2</sup>=R<sup>5</sup>=R<sup>6</sup>=R<sup>7</sup>=Y=H、R<sup>4</sup>=Meであることが好ましい。20

#### 【0033】

本発明の実施形態は、上記の式I中、R<sup>1</sup>=OHであり；R<sup>2</sup>=R<sup>5</sup>=R<sup>6</sup>=R<sup>7</sup>=Y=H、A=- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、B=- (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-であり；ステロイド環系のC1とC2の間に二重結合が存在せず；ステロイド環系のC5とC6の間に二重結合が存在し、R<sup>3</sup>は存在せず；R<sup>4</sup>=Meであることがより好ましい。なお一層好ましくは、式中、n=0、y=1である化合物である。

#### 【0034】

本発明の実施形態では、その薬学的に許容されるエステル、塩および酸付加塩を含め、下記から選択される式Iの化合物であることが最も好ましい：

17 -スピロ-[5-アンドロステン-17, 2'-オキシラン]-3-オール；30

(20S)-3-, 21-ジヒドロキシ-17-, 20-エポキシ-5-ブレグネン；

(20S)-3-ヒドロキシ-17-, 20-エポキシ-20-(2-プロモエチニル)-5-アンドロステン；および

3-, 21-ジヒドロキシ-17-, 20-エポキシ-5-ブレグネン。

#### 【0035】

本明細書では、以下の個々の用語またはその組み合わせを以下の通り定義する。

#### 【0036】

本明細書では、「アルキル」という語は、直鎖または分枝鎖または環状飽和炭化水素基を指す。好ましいのは、C<sub>1</sub>~C<sub>16</sub>アルキル基である。特に他に限定しない限り、アルキル基は、非置換であっても、任意の可能な位置で置換基にて単置換されていても、可能な場合には、複数置換されていてもよい。特に他に限定しない限り、環状アルキル基は、たとえば、アダマンチル、ノルボルニルおよび関係するテルペン類のような单環式、二環式、三環式および多環式環を含む。40

#### 【0037】

本明細書では、「ヘテロシクロアルキル」という語は、1、2、3または4個のO、NまたはS原子あるいはO、N、S原子の組み合わせを含む環状炭化水素基を指し、たとえば、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロ-2H-ピラニル、モルホリニル、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロ-2H-チオピラニルがある。特に他に限定しない限り、ヘテロシクロアルキル基は、非置換であっても、任意の可能な位置で置換基にて単置換されていても、50

可能な場合には、複数置換されていてもよい。

**【0038】**

本明細書では、「ハロアルキル」という語は、1つ以上のハロゲンで置換されているアルキル基を指す。

**【0039】**

本明細書では、「アルケニル」という語は、単独あるいは組み合わせて、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を含む直鎖または分枝鎖または環状の不飽和炭化水素基を指す。特に他に限定しない限り、アルケニル基は、非置換であっても、任意の可能な位置で置換基にて単置換されていても、可能な場合には、複数置換されていてもよい。好ましいのはC<sub>2</sub>～C<sub>16</sub>アルケニル基である。アルケニルは、2個の連続した二重結合を有するアレニル基を含むものとする。10

**【0040】**

本明細書では、「ヘテロシクロアルケニル」という語は、1、2、3または4個のO、NまたはS原子あるいはO、N、S原子の組み合わせを含有し、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を含む環状不飽和炭化水素基を指す。特に他に限定しない限り、ヘテロシクロアルケニル基は、非置換であっても、任意の可能な位置で置換基にて単置換されていても、可能な場合には、複数置換されていてもよい。

**【0041】**

本明細書では、「アルキニル」という語は、単独あるいは組み合わせて、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を含む直鎖または分枝鎖または環状の不飽和基を指す。特に他に限定しない限り、アルキニル基は、非置換であっても、任意の可能な位置で置換基にて単置換されていても、可能な場合には、複数置換されていてもよい。好ましいのはC<sub>2</sub>～C<sub>16</sub>アルキニル基である。20

**【0042】**

本明細書では、「アリール」という語は、単独あるいは組み合わせて、共役 電子を持つ少なくとも1個の環を含む芳香族基、炭素環式アリール基およびビアリール基を指し、これらは非置換であっても、任意の可能な位置で置換基にて単置換されていても、可能な場合には、複数置換されていてもよい。好ましいのはC<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>アリール基である。典型的なアリール基として、フェニル基、ナフチル基、フェナントリル基、アントラシル基、インデニル基、アズレニル基、ビフェニル基、ビフェニレニル基およびフルオレニル基が挙げられる。30

**【0043】**

「ビアリール」という語は、他のアリール基で置換されているアリール基を表す。

**【0044】**

「炭素環式アリール」という語は、芳香族環の環原子が炭素原子である基をいう。

**【0045】**

本明細書では、「チオ」という語は、-SR<sup>10</sup>を指し、R<sup>10</sup>は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールであり、いずれも任意に置換されていてもよい。

**【0046】**

本明細書では、「スルフィニル」という語は、-SOR<sup>10</sup>を指し、R<sup>10</sup>は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールであり、いずれも任意に置換されていてもよい。40

**【0047】**

本明細書では、「スルホニル」という語は、-SO<sub>2</sub>R<sup>10</sup>を指し、R<sup>10</sup>は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールであり、いずれも任意に置換されていてもよい。

**【0048】**

本明細書では、「スルホンアミド」という語は、-SO<sub>2</sub>NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>を指し、R<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>は独立に、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アリールアルキルまたは50

ヘテロアリールであり、いずれも任意に置換されていてもよい。

**【0049】**

「任意に置換されている」または「置換されている」という語は、任意の可能な位置で以下に記載する置換基により置換されている基をいう。本発明に有用な上述の残基の置換基は、本発明の化合物の生物活性を大きく減弱しない基である。本発明の化合物の生物活性を大きく減弱しない置換基として、たとえば、低級アルキル(非環状および環状)、アリール(炭素環式アリールおよびヘテロアリール)、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、メルカプト、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、ニトロ、アルカノイル、アルカノイルオキシ、アルカノイルオキシアルカノイル、アルコキシカルボキシ、カルボアルコキシ、カルボキサミド、ホルミル、カルボキシ、ヒドロキシ、シアノ、アジド、イソシアノ、イソチオシアノ、オキシム、ケトおよびその環状ケタール、アルカノイルアミド、ヘテロアリールオキシ、O-アロイル、OアルキルOH、OアルケニルOH、OアルキニルOH、OアルキルNX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、OアルケニルNX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、OアルキニルNX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、NH-アシリル、NH-アロイル、CF<sub>3</sub>、COOX<sub>3</sub>、SO<sub>3</sub>H、PO<sub>3</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、OPo<sub>3</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、CONX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>が挙げられ、X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>は各々独立にHまたはアルキルまたはアルケニルまたはアルキニルを指し、あるいはX<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>は共に、約4~約7個の環原子、および任意にO、NまたはSから選択される1個の追加のヘテロ原子を持つ複素環の一部を含むか、あるいはX<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>は共に、約5~6個の環原子を持つイミド環の一部を含み、X<sub>3</sub>は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシ-低級アルキルまたはアルキル-NX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>を指す。10 20

**【0050】**

本明細書では、「低級」という語は、1~6個の炭素原子を含む有機基または化合物に関する。こうした基は直鎖でも、分枝鎖でも、環状でもよい。

**【0051】**

「ヘテロアリール」という語は、1、2、3または4個のO、NまたはS原子を含み、かつ1つ以上の環に非局在化している6、10または14個の電子を持つ5~14員環状不飽和基を含む炭素をいい、たとえば、チエニル、ベンゾ[b]チエニル、ナフタ[2,3-b]チエニル、チアントレニル、フリル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサンチニル、2H-ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、インドイル、インダゾリル、ブリニル、4H-キノリジニル、イソキノリル、キノリル、フタジニル、ナフチリジニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテルジニル、5aH-カルバゾイル、カルボゾイル、カルボリニル、フェナントリジニル、アクリンジニル、オキサゾリル、ピリミジニル、ベンズイミダゾリル、トリアゾリルがあり、各々は、上記で論じたように任意に置換されていてもよい。30

**【0052】**

本発明はまた、酸付加塩を含め、式Iの化合物の薬学的に許容されるエステルおよび塩を含む。

**【0053】**

当業者であれば、式Iの化合物に立体中心が存在することを認識するであろう。したがって、本発明は、混合物または純粋なジアステレオマーとして、式Iのあらゆる可能な立体異性体および幾何異性体を含む。式Iの化合物の単一のジアステレオマーが望ましい場合、最終生成物を分離するか、異性体的に純粋な出発原料あるいは任意の適切な中間体からの立体特異的合成により得ることができる。40

**【0054】**

本明細書に定義する式Iの化合物の結晶体(たとえば、多形体)、エナンチオマー体および互変異性体およびその薬学的に許容される塩または酸付加塩は、本発明(化合物、医薬組成物、方法、使用など)の範囲内に含まれる。

**【0055】**

式Iの化合物の具体例として以下がある。

- 1) 17 -スピロ-[5-アンドロステン-17, 2'-オキシラン]-3 -オール(「BNN-50」)、
- 2) (20S)-3 , 21-ジヒドロキシ-17 , 20-エポキシ-5-プレグネン(「BNN-124」)、
- 3) (20S)-3 -ヒドロキシ-17 , 20-エポキシ-20-(2-ブロモエチニル)-5-アンドロステン、
- 4) 3 , 21-ジヒドロキシ-17 , 20-エポキシ-5-プレグネン(「BNN-93」)

式Iの化合物は、当業者によく知られた従来の合成反応により、市販されているステロイド化合物から調製しうる。式中、Xが酸素原子である、好ましい本発明の実施形態は、適切な順序で一連の合成ステップを用いて、重要な中間体(20S)-3 -(t-ブチルジフェニルシリルオキシ)-21-ヒドロキシ-17 , 20-エポキシ-5-プレグネンから調製することができる。前記合成ステップとしては、酸化、Wittig反応、還元、水素化、オキシム形成、ハロゲン化、炭素-炭素カップリング反応およびC3の保護基の除去があるが、これに限定されるものではない。t-ブチルジフェニルシリルオキシ以外の好適なヒドロキシリル保護基を用いてもよい。

#### 【0056】

WO2008/15534は、BNN-50、BNN-93、BNN-124、(20S)-3 -ヒドロキシ-17 , 20-エポキシ-20-(2-ブロモエチニル)-5-アンドロステン、3 , 22-ジヒドロキシ-17 , 21-オキセタニル-5-プレグネンおよび17 -スピロ-[3 -ヒドロキシ-5-アンドロステン-17, 2'-オキシラン-7-イリデンアミノオキシ]-酢酸を含む、種々の調製方法および調製例を開示している。

#### 【0057】

本発明によれば、適応疾患を治療するための標準的方法、これらに限定されるものではないが、経口、非経口、舌下、経皮、直腸、または吸入によるもしくは頬側投与による投与で処方を投与することができる。さらに、組成物を、注射または持続注入法による非経口投与用に処方することができる。組成物を徐放性形態としてまたはデポー製剤として処方することができる。投与経路は、活性化合物が抗炎症効果を発揮するのに望ましい部位へ当該活性化合物を有効に輸送する任意の経路であり得る。当業者は前述の説明を、レシピエントを害することのない任意の他の投与方法に応用することができる。

#### 【0058】

本明細書で使用する場合、「治療する」または「治療」という語は、予防を含む。

#### 【0059】

本発明の医薬組成物は、受け入れられている手順に従って、被検体、動物またはヒトにおいて、毒性は現れないが所望の薬力学的活性を発揮するに足る量の、本発明の活性化合物またはそのような化合物の混合物を無毒性の薬学的担体と組み合わせることで、通常の投薬単位形態で調製される。好ましくは、前記組成物は、活性量だが、無毒性量の活性成分を含み、その量は、具体的な所望の生物活性および患者の状態によって決まる。

#### 【0060】

使用する薬学的担体は、たとえば、固体でも、あるいは、液体でもよい。代表的な固体担体には、ラクトース、白土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、微結晶性セルロース、ポリマー-ヒドロゲルなどがある。典型的な液体担体には、プロピレングリコール、-シクロデキストリンの水溶液、シロップ、ピーナッツ油およびオリーブ油および同種のエマルジョンがある。同様に、担体または希釈液は、グリセロールモノステアレートまたはグリセロールジステアレート単独、あるいは、ワックス、マイクロカプセル、ミクロスフェア、リポソームおよび/またはヒドロゲルとの組み合わせなど、当該技術分野で公知の任意の時間遅延材料を含んでもよい。

#### 【0061】

固体担体の場合、製剤は、油中で単純粉碎化、微粉化またはナノサイズ化を行っても、微粉末またはペレット状のまま錠剤化しても、硬ゼラチンまたは腸溶性カプセルに加えてても、あるいは、トローチ、薬用キャンディまたは坐剤の形態であってもよい。液体担体の場合、製剤は、アンプルなどの液体形態でも、薬学的に許容される防腐剤などと混合した

10

20

30

40

50

水性または非水性液体懸濁液などの液体形態でもよい。少量の投薬量が求められる場合、鼻スプレー、舌下投与および時間放出性皮膚パッチも、局所投与に好適な医薬品形態である。

#### 【実施例】

##### 【0062】

###### (実験セクション)

以下の実施例は、本発明をよりよく理解するために記載し、いかなる形であれ本発明の範囲を制限すると解釈されるべきではない。

##### 【0063】

以下の実施例において、デヒドロエピアンドロステロン（DHEA）ならびにその関連スピロ化合物BNN-50、BNN-93およびBNN-124（前記定義）が、*ex vivo*のT細胞応答、ならびに実験的自己免疫性脳脊髄炎およびアレルギー性気道炎症の間の免疫介在性疾患および*in vivo*の反応に対して抑制性であるかを調べた。10

##### 【0064】

###### [実施例1]

###### (*ex vivo*のT細胞応答の抑制における合成スピロステロイドの活性)

リンパ節（LN）細胞を、予備刺激されていないID011.10 TCR Tgマウス（OVAペプチド323～339に反応する）から培養し、これをDHEAまたはスピロ化合物BNN-50、BNN-93およびBNN-124または対照RPMIの存在下、OVAで刺激した。DHEAおよびスピロアナログでの処理の結果、抗原に反応するT細胞の増殖が有意に減少した（図1）。20

##### 【0065】

DHEAおよびアナログがCD4<sup>+</sup>T細胞に対して直接的に免疫抑制効果を及ぼすか試験するために、精製CD4<sup>+</sup>T細胞を、マイトイシンCで処理された脾臓細胞およびOVAペプチド323～339とともに予備刺激されていないID011.10 TCR Tgマウスから培養した。この場合も、DHEAおよびスピロ化合物での処理の結果、IL-2およびIFN-γの増殖および分泌が有意に減少した（図2）。精製CD4<sup>+</sup>T細胞を予備刺激されていないBALB/cマウスから-CD3/-CD28（非抗原特異性）で刺激した場合、DHEAおよびスピロ化合物の同じ抑制効果が観察された（図3）。フローサイトメトリー分析後の全ての培養物においてCD4<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>細胞の数が類似していることから明らかなように、CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖反応の減少は、細胞死の増加によるものではなかった（図4）。30

##### 【0066】

以上より、DHEAおよびスピロ化合物BNN-93、BNN-124、BNN-50は、T細胞応答一般に対して免疫抑制効果を有するとみなされた。

##### 【0067】

###### [実施例2]

（合成スピロステロイドの、MOGペプチドで誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）から防御する能力）

DHEAおよびスピロ化合物の*in vivo*の免疫抑制効果を評価するために、DHEAおよびそのスピロアナログが実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を防ぐか立証するための試験を行った。EAEは中枢神経系（CNS）の自己免疫疾患であり、破壊的な自己反応性Tリンパ球による中枢神経系の浸潤、およびその後の脱髓ならびに軸索および神経変性の結果として生じる。40

##### 【0068】

C57BL/6マウスにおいて、病原因性ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）ペプチド（アミノ酸35～55）に対してこれらを免疫化することにより、急性EAEを誘導した。BNN-93、BNN-124、BNN-50もしくはDHEA（2mg/マウス）またはPBS（対照）を、EAE誘導の日から、マウスを安樂死させた26日目まで、毎日、腹腔内投与した（図5）。マウスを盲検形式で臨床症状（麻痺）について毎日モニタリングした。組織学的評価（脳および脊髄断片に関してH&Eで染色）ならびにT細胞応答およびサイトカイン放出の測定用の*ex vivo*培養を実施するために、組織（脳、脊髄、流入領域リンパ節（DLN））を採取した。50

## 【0069】

DHEAおよびスピロ化合物の投与の結果、麻痺の程度が軽減された。全体として、臨床経過が改善され、平均最大スコアが減少した（図6および7）。対照と比較して、減少した臨床スコアは、発症遅延および低発症率と関連していた（図7）。DHEAおよびスピロ化合物の防御効果はまた、脊髄における炎症の軽減とも関連していた（図8）。

## 【0070】

以上より、スピロ化合物ならびにDHEAは、MOGペプチドで誘導されるEAEから防御し、臨床スコアの減少および発症率の低下、疾患発症の遅延ならびにCNSにおける炎症の軽減に貢献した。

## 【0071】

EAEを発症するように誘導されたマウスから得たリンパ球細胞（T細胞）の、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する増殖反応およびサイトカイン分泌も試験した。DHEAおよびスピロ化合物で治療されたマウスからの流入領域リンパ節細胞は、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対して有意に減少した増殖を示し（図9a）、実質的に増加した量のIFN- $\gamma$ およびIL-10（図9bおよび9c）を産生し、これらは最近のいくつかの研究で示されるように調節特性を有すると考えられる。加えて、炎症性サイトカインIL-17の分泌が増加したが（図9d）、その絶対的増加はIFN- $\gamma$ 増加に比べると非常に低かった。実際に、DHEAおよびスピロ化合物はIFN- $\gamma$ /IL-17比を有意に増加させ（図9e）、この知見はEAEに対する防御効果と一致した。したがって、DHEAおよびスピロ化合物は、高病原性Th17反応のバランスを低病原性Th1反応へとシフトさせることによりEAEを抑制しているのであろう。

10

## 【0072】

全体として、これらの結果は、DHEAおよびそのスピロアナログでの治療の結果、病原性免疫応答が有意に抑制されることを示している。

## 【0073】

DHEAおよびそのスピロアナログが実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の発症後においても防御的であるか見出すための試験も実施した。これらの試験に関して、急性EAEをC57BL/6マウスにおいて前述のように誘導した。BNN-93、BNN-124、BNN-50もしくはDHEA（2mg/マウス）またはPBSを、EAEの発症日から、マウスを安樂死させた26日まで、毎日腹腔内投与した（図10）。マウスを臨床症状（麻痺）について盲検形式で毎日モニタリングした。組織学的評価（脳および脊髄断片に関してH&Eで染色）ならびにT細胞応答およびサイトカイン放出の測定用のex vivo培養を実施するために、組織（脳、脊髄、DLN）を採取した。

20

## 【0074】

DHEAおよびスピロ化合物を投与した結果、麻痺の程度が軽減された。以上より、臨床経過が改善/逆転され、平均最大スコアが減少した（図11および12）。

## 【0075】

EAEを発症するように誘導されたマウスから得たリンパ球細胞（T細胞）の、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対するサイトカイン分泌も試験した。DHEAおよびスピロ化合物で治療されたマウスからの流入領域リンパ節細胞は、非常に増大した量のIL-10を産生した（図13a）。加えて、IFN- $\gamma$ 、ならびに炎症性サイトカインIL-17の分泌は、実質的に減少した（図13bおよび13c）。したがって、DHEAおよびスピロ化合物は、高病原性Th17反応のバランスを、主にIL-10の産生により特徴づけられるT調節細胞反応へとシフトさせることにより、EAE発症から防御することができる。

30

## 【0076】

## [実施例3]

（TH-2免疫応答の阻害およびアレルギー性気道炎症からの防御における合成スピロステロイドの活性）

TH-2介在性免疫応答およびその後の疾患発症の間、アレルギー性喘息として確立されているマウスモデルを用いて、DHEAおよびスピロ化合物のin vivoの効果を調べた。BALB/cマウスを0および12日目に0.2mlのミョウバン中0.01mgのトリ卵白アルブミン（OVA）で

40

50

腹腔内により感作し、18～20日目にエアロゾル化OVA（5%20分）に曝露した。マウスに2mg/マウスのDHEAまたはスピロ化合物（BNN-93もしくはBNN-124もしくはBNN-50）あるいはPBSを0、1、2、12、13、14、18、19および20日目に投与した。

#### 【0077】

DHEAまたはスピロ化合物のいずれかで治療したマウスは、PBS治療マウスと比較して、気管支肺胞洗浄（BAL）中の好酸球およびリンパ単核細胞の数が有意に減少した（図14a）。肺白血球浸潤も、DHEAおよびスピロ化合物で治療したマウスにおいて有意に減少した（図14b）。さらに、流入領域リンパ節の免疫応答を調べると、DHEAまたはスピロ化合物のいずれかでの治療の結果、OVA特異的T細胞増殖が有意に減少することが判明した（図14c）。加えて、OVA特異的IgE、IgG1およびIgG2aのレベルは、DHEAおよびスピロ化合物で治療したマウスにおいて有意に減少した。さらに、DHEAまたはスピロ化合物のいずれかで治療したマウスは、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞（T調節性細胞）および抑制性CD11c<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>形質細胞様樹状細胞（pDC）の数が実質的に増大した。全体として、これらの結果は、DHEAおよびスピロ化合物が、調節免疫細胞サブセットの誘導に伴って、アレルギー性気道炎症、Th2反応およびB細胞反応を抑制するという証拠を提供する。10

#### 【0078】

##### 〔実施例4〕

（MOGペプチド誘導の確立したEAEの抑制における合成スピロステロイドの活性）

DHEAおよびそのスピロアナログがマウス集団ですでに確立したEAEの抑制に有効であるか立証するための試験を行った。20

#### 【0079】

動物を病原性ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）ペプチド（アミノ酸35～55）に対して免疫化することによって、C57BL/6マウスにおいて急性EAEを誘導した。病徵が12日程度で明らか（スコア1～2）になるまで、マウスを治療しないまま放置した。BNN-93、BNN-124、BNN-50もしくはDHEA（2mg/マウス）またはPBS（対照）を、EAE誘導後13日からマウスを安樂死させた26～28日目まで毎日腹腔内投与した（図15）。マウスを盲検形式で臨床症状（麻痺）について毎日モニタリングした。組織学的評価（脳および脊髄断片に関してH&Eで染色）ならびにT細胞応答およびサイトカイン放出の測定用のex vivo培養を実施するために組織（脳、脊髄、DLN）を採取した。

#### 【0080】

疾患発症後に開始するDHEAおよびスピロ化合物の投与の結果、麻痺の程度が著しく減少した。全体として、臨床経過が有意に改善され、平均最大スコアが減少した（図16および17）。DHEAおよびスピロ化合物の防御効果は脊髄における炎症の軽減とも関連していた（図18）。

#### 【0081】

以上より、スピロ化合物ならびにDHEAは進行中のMOGペプチドで誘導されたEAEを抑制し、臨床スコアの減少およびCNSにおける炎症の軽減に貢献した。

#### 【0082】

EAEを発症するように誘導されたマウスからのリンパ球細胞（T細胞）の、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する増殖反応およびサイトカイン分泌も試験した。DHEAおよびスピロ化合物で治療されたマウスからの流入領域リンパ節細胞は、MOG<sub>35-55</sub>ペプチドに対する増殖の著しい減少を示し（図19a）、実質的に減少した量のIFN-+Treg細胞を有意に増加させ、この知見はEAEに対する防御効果と一致した（図20）。したがって、DHEAおよびスピロ化合物は、Treg細胞を増加させつつ、病理性Th1およびTh17免疫応答を減少させることにより進行中のEAEを抑制することができる。マウスを疾患がピーク（17日目）の時点で安樂死させた場合にも同様の結果が得られた（図21、22および23a、b、c）。

#### 【0083】

50

20

30

40

50

全体として、これらの結果は、進行中のEAEのマウスをDHEAおよびそのスピロアナログで治療すると、病因性免疫応答および症状が有意に抑制されたことを示す。

#### 【0084】

##### [実施例5]

(移植された免疫細胞での疾患の抑制における合成スピロステロイドの活性)

DHEAおよびスピロアナログによって抑制されたEAEにおける免疫細胞が、1つのマウス集団から別のマウス集団に適合移植された場合、EAEに対する活性を依然として有するか調べるための実験を行った。

#### 【0085】

DHEAまたはBNN-93のいずれかで疾患発症直後(12~17日目)に治療されたEAEを有するマウスから得られた流入領域リンパ節(DLN)細胞を、EAE進行中のレシピエント(12日前後)に適合移植した。これらのDLN細胞は、EAE発症を抑制し、結果、PBSで治療されたドナーからのDLN細胞を適合移植されたEAEを有するマウスと比較して、早く回復し、平均最大疾患スコアが有意に減少することが見いだされた(図24および25)。ドナーDLN細胞は、対照マウスにおいて疾患のピークであった17日目に得た。この防御は、マウスを安樂死させた28~30日目まで観察された。DHEAまたはBNN-93で治療されたEAEを有するドナーからのDLN細胞を適合移植されたマウスから得られたDLN細胞は、MOG<sub>35-55</sub>に対して有意に減少したex vivo増殖を示し、減少したレベルの上清IFN- $\gamma$ およびIL-17を産生した(図26a、b、c)。さらに、Th反応の分化および活性化、ならびに高炎症性IL-17分泌T細胞の分化および活性化において主要な役割を果たすCD11c<sup>+</sup>樹状細胞の動員は、流入領域リンパ節において実質的に減少し、一方、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節T細胞の動員は増加した(図27a、b、c)。

#### 【0086】

前記結果は、DHEAおよびスピロ化合物で治療されたマウスが、レシピエントに移植されると進行中の疾患を下方制御することができる免疫調節能力を「保有する」免疫細胞を発生させることを示す。

#### 【0087】

DHEA、BNN-93またはPBSで治療されたEAE誘導マウス由来のCD4<sup>+</sup>T細胞(Tヘルパーリンパ球)が、疾患抑制を移植できるか確認するための試験も実施した。EAEが進行中のレシピエント中に適合移植された、DHEAまたはBNN-93で治療されたEAE誘導マウスから得られた、CD4<sup>+</sup>T細胞は、平均最大EAEスコアを有意に減少させた(図28および29)。対照的に、PBSで処理されたEAEマウス由来のCD4<sup>+</sup>T細胞の適合移植は、疾患を軽減しなかった。したがって、DHEAまたはBNN-93で治療されたEAEドナー由来のDLN細胞を適合移植されたマウスから得られたDLN細胞および脾臓細胞は、ex vivoでMOG<sub>35-55</sub>に対して有意に減少した増殖を示した(図30)。

#### 【0088】

これらの結果は、EAEの間のDHEAおよびスピロ化合物による治療の結果、進行中のEAEを単独で抑制可能なCD4<sup>+</sup>T細胞が発生することを示す。

#### 【0089】

EAE誘導され、DHEAまたはBNN-93で治療されたマウス由来のCD4<sup>+</sup>T細胞を、TおよびB細胞を有しないレシピエントマウス(C57BL/6 Rag-/-)中へ適合移植した結果、百日咳毒素を注射した後、非常に低いEAEスコアから無疾患状態(BNN-93)が誘導された(図31および32)。対照的に、PBSで治療されたEAE誘導マウスから得られたCD4<sup>+</sup>T細胞の適合移植の結果、C57BL/6 Rag-/-レシピエントにおいて疾患が発症した。DHEAまたはBNN-93で治療されたEAEドナー由来のCD4<sup>+</sup>T細胞を適合移植されたレシピエントマウスから得られたDLN細胞は、MOG<sub>35-55</sub>に対する実質的に減少したex vivo増殖ならびにIFN- $\gamma$ およびIL-17の減少した産生を示した(図33a、b、c)。これらの結果は、治療マウス由来のCD4<sup>+</sup>T細胞の病因性が有意に低いことを示す。

#### 【0090】

##### [実施例6]

10

20

30

40

50

(治療中止後の疾患の抑制における合成スピロステロイドの活性)

EAEがDHEAおよびスピロアナログにより抑制された免疫細胞が、治療中止後でもマウス集団において存続しているか調べるために実験を行った。

#### 【0091】

C57BL/6マウスを前記と同様にしてEAEを誘導させ、その後、疾患発症直後(13日前後)に15日間、DHEA、BNN-93またはPBSで治療し、その後、治療を停止した。マウスをその後さらに45日間、EAEの臨床兆候について毎日モニタリングし続けた。あらかじめDHEAまたはBNN-93で15日間だけ治療したマウスはEAE発症から防御されたままであり、高いスコア疾病経過を示し続ける対照マウスと比較して、それらの疾患スコアは悪化することなく変化しないままであった(図34および35)。

10

#### 【0092】

[実施例7]

(Th17細胞分化およびFoxp3<sup>+</sup>Treg細胞生成に対する合成スピロステロイドの効果)

ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞をTh17細胞分化条件下(rTGF-1およびrIL-6とともに)、in vitroで培養し、DHEA、BNN-93、BNN-124、BNN-50またはRPMI(対照培地)で4日間処理した。DHEAおよびスピロアナログでの処理の結果、CD4<sup>+</sup>IL-17分泌T細胞の数が増加し(図36)、Th17分化細胞のなかでもCD4<sup>+</sup>IL-10分泌T細胞の数が有意に増加し、これらは重要な免疫調節性特性を有すると考えられる(図37)。

#### 【0093】

さらに、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞をTreg細胞生成条件下(rTGF-1およびrIL-2とともに)、in vitroで培養し、DHEAまたはBNN-93、BNN-124、BNN-50もしくはRPMIで5日間処理した。DHEAおよびスピロアナログでの処理は、rTGF-1があっても、なくても、結果としてFoxp3<sup>+</sup>Treg細胞の数の有意な増加および増殖の増加をもたらした(図38および39)。

20

#### 【0094】

これらの結果は、DHEAおよびスピロ化合物が免疫抑制性能力を有するCD4<sup>+</sup>T細胞サブセットの分化および生成に影響を及ぼすことを示す。

#### 【0095】

[実施例8]

(別の(MOG以外の)抗原に対する応答を規定する実験)

EAEがDHEAおよびスピロアナログにより抑制された免疫細胞の、EAE発症に関する種々の抗原に対する応答を調べるための実験を行った。

30

#### 【0096】

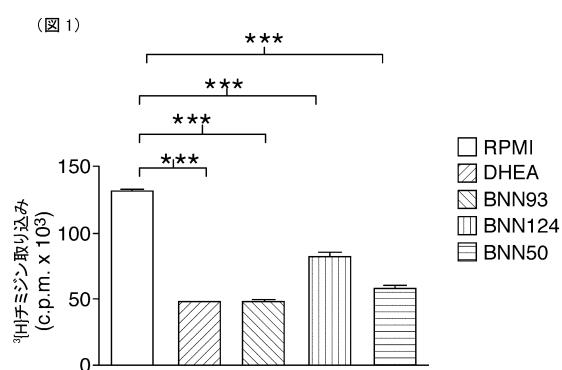
C57BL/6マウスを、EAEを発症するように誘導し、DHEA、BNN93またはRPMI(対照)で発病直後に15日間の治療を始めた。治療を中止し、次いでマウスにOVA/CFA(完全フロイントアジュバント)を注射した。マウスをEAEの臨床徵候について毎日モニタリングし、DHEAまたはBNN93で治療されたもの(EAEから明らかに保護されている)は、対照マウスと比較して、症状は悪化せず、安定した状態を示した。

#### 【0097】

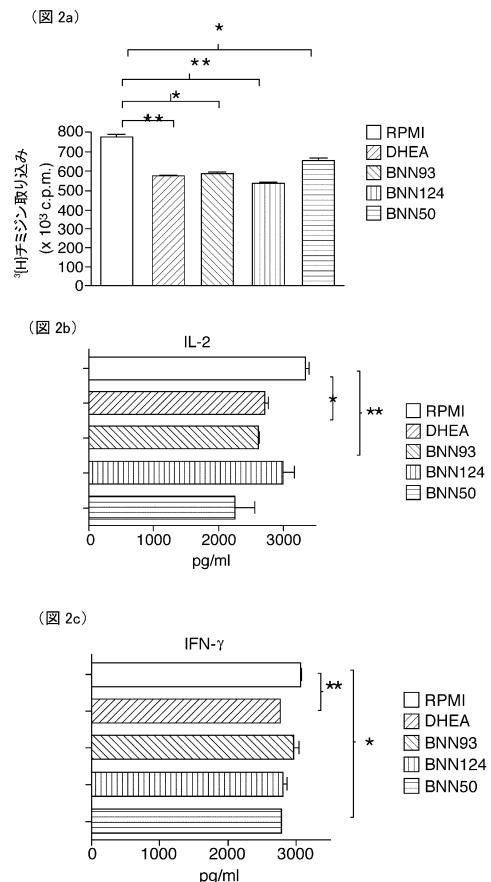
OVA/CFA免疫化後、DHEAまたはBNN93で治療されたマウスは、ex vivoでOVAに対して実質的に増大したT細胞応答(<sup>3</sup>H-チミジン取り込みとして示される)(図40)、ならびにIFN- $\gamma$ の増大した産生を示した。結果は、神経ステロイドは、EAEに対して抑制性であるが、それらはEAE発症に関するもの以外の抗原に対する免疫細胞の反応を防止しないことを示す。むしろ、マウスが曝露される新しい抗原に対する応答が増強される。

40

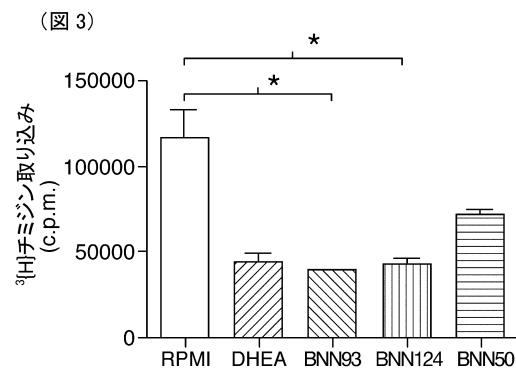
【図1】



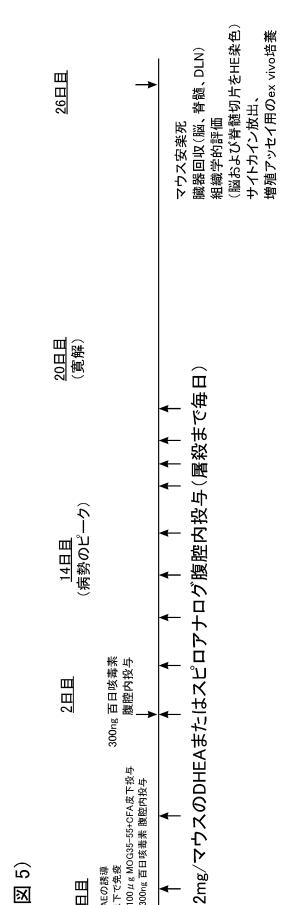
【図2】



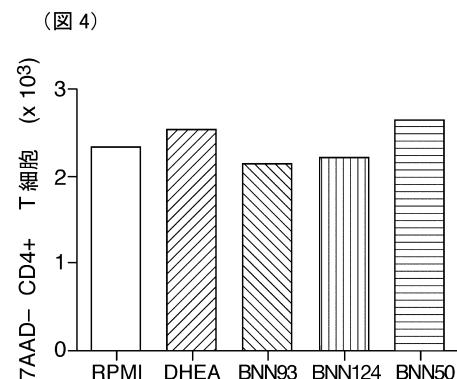
【図3】



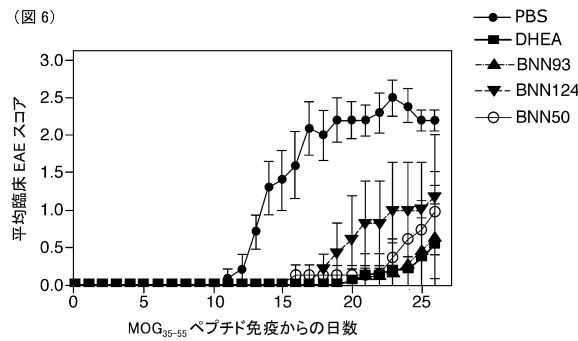
【図5】



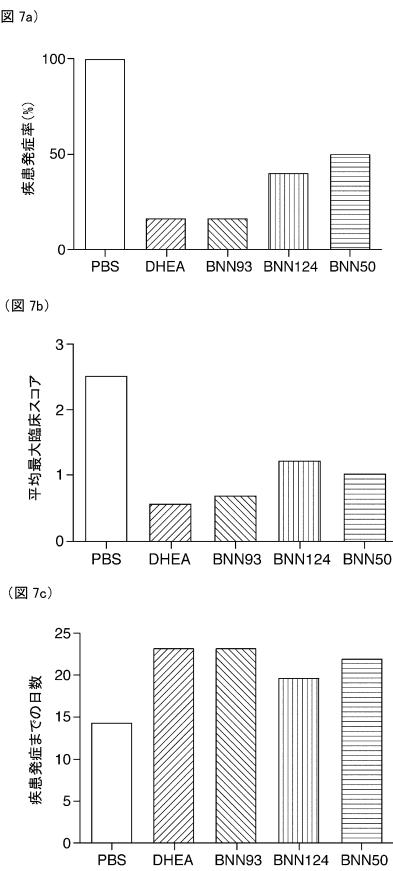
【図4】



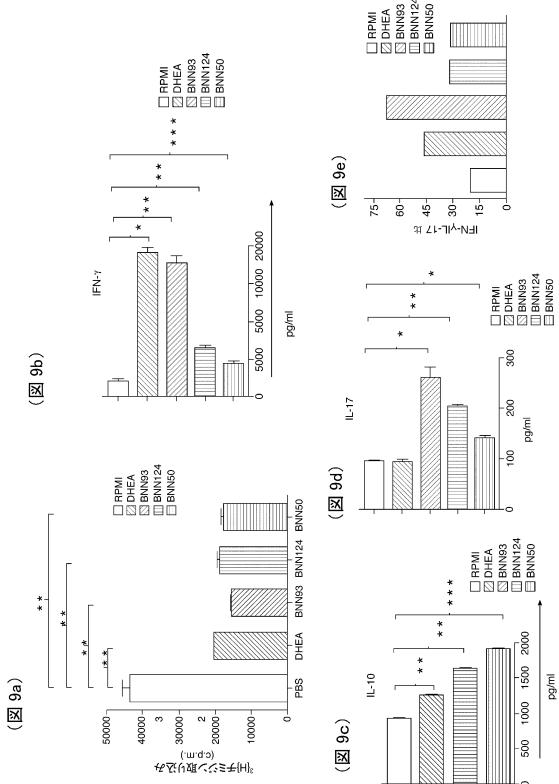
【図6】



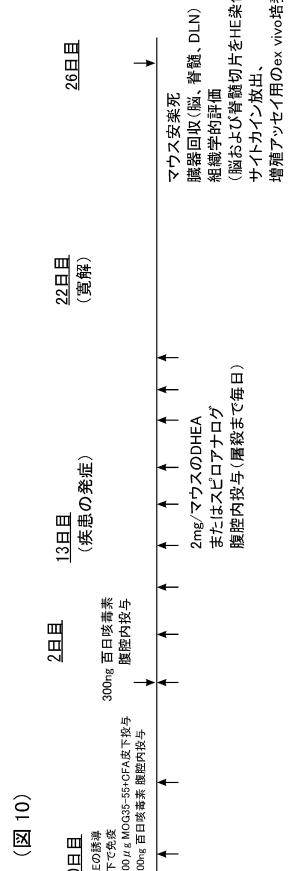
【図7】



【図9】

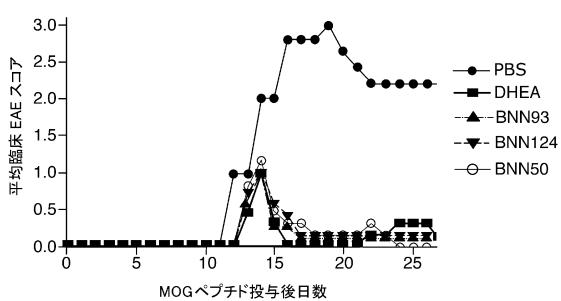


【図10】



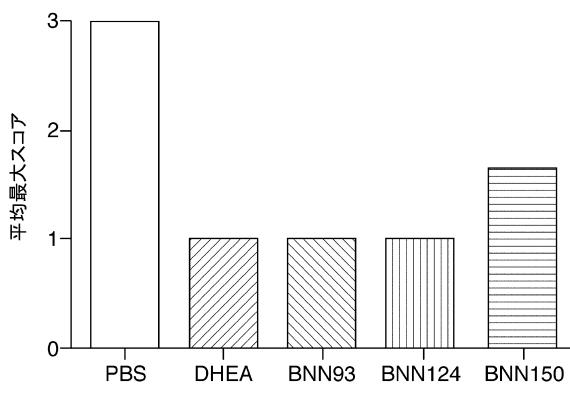
【図 1 1】

(図 11)



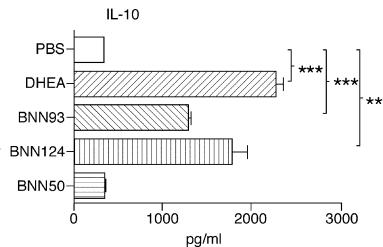
【図 1 2】

(図 12)

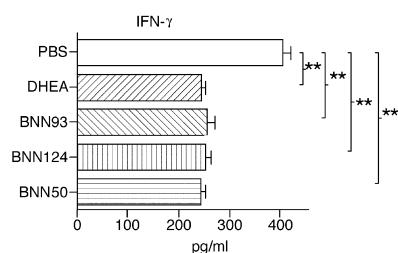


【図 1 3】

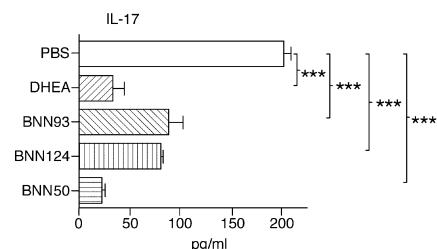
(図 13a)



(図 13b)

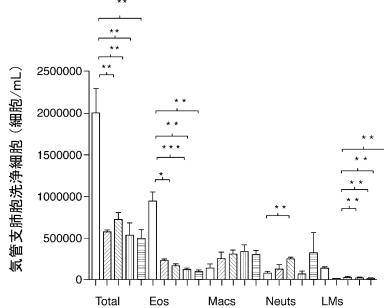


(図 13c)

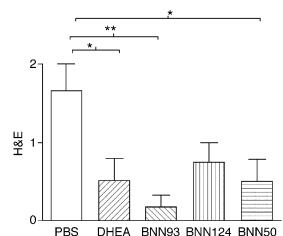


【図 1 4】

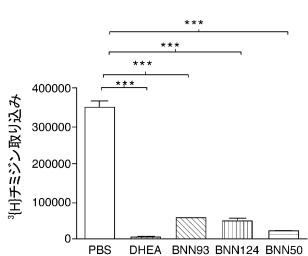
(図 14a)



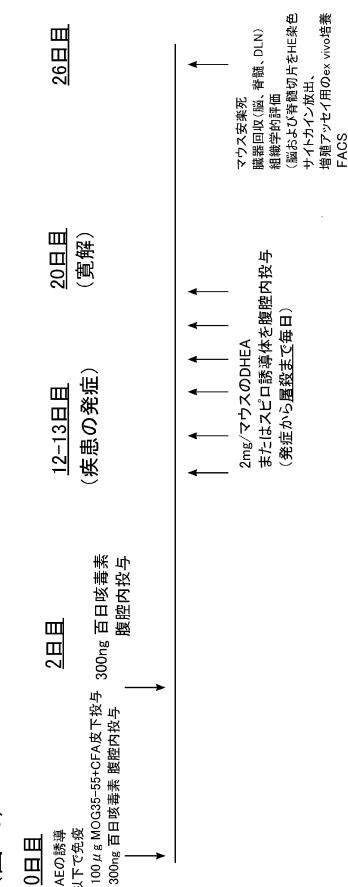
(図 14b)



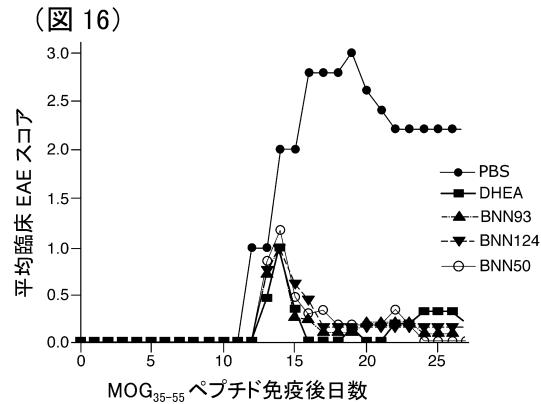
(図 14c)



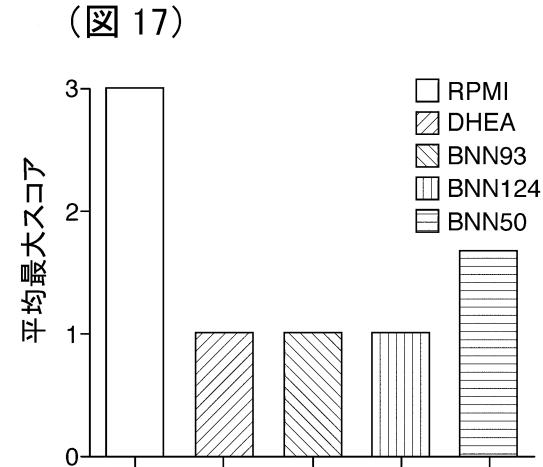
【図 1 5】



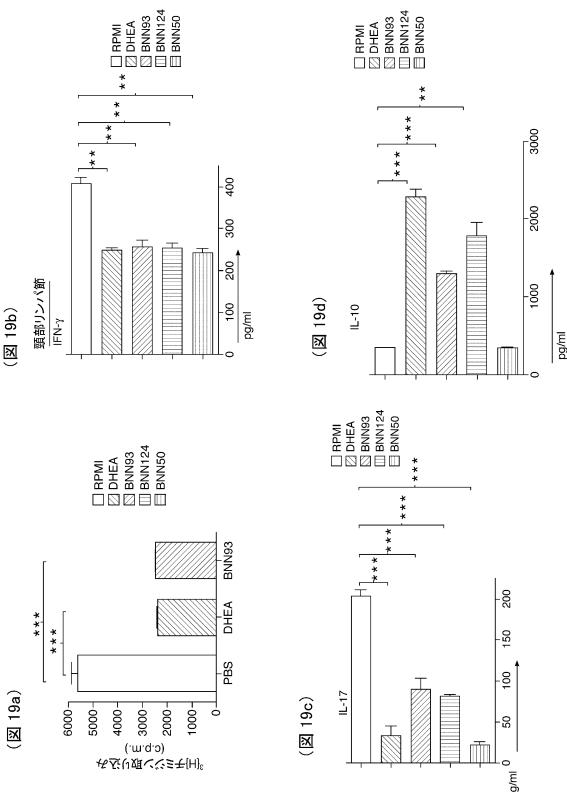
【図16】



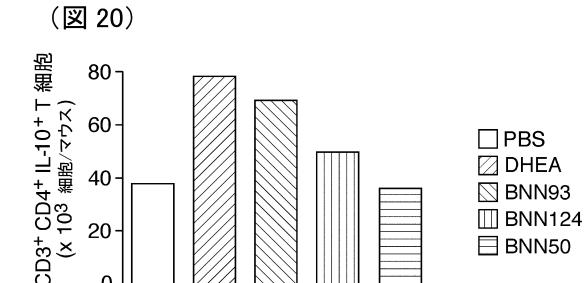
【図17】



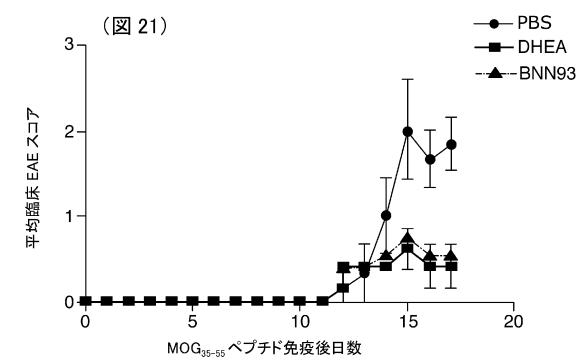
【図19】



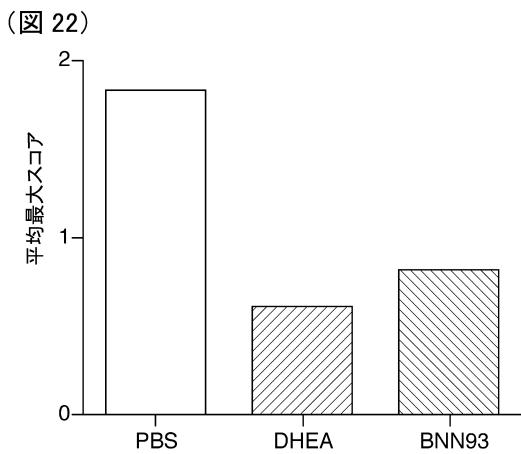
【図20】



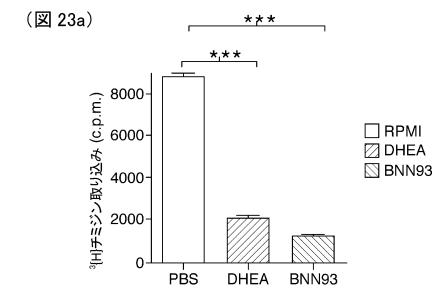
【図21】



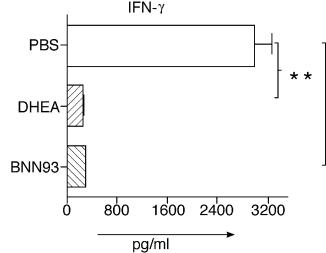
【図22】



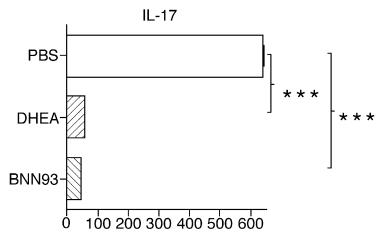
【図23】



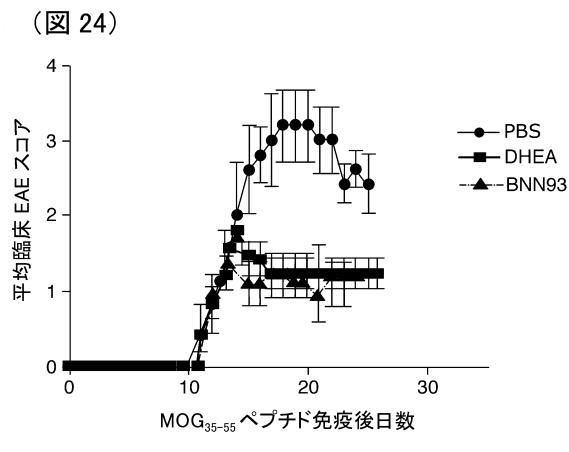
(図23b)



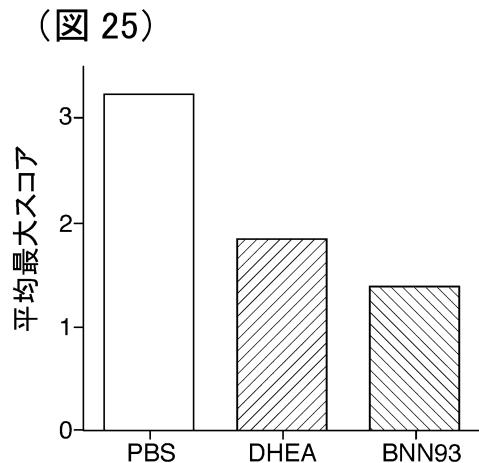
(図23c)



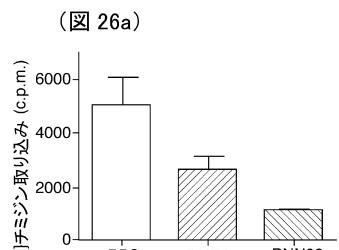
【図24】



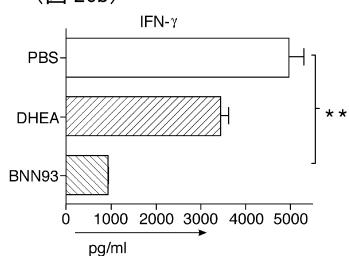
【図25】



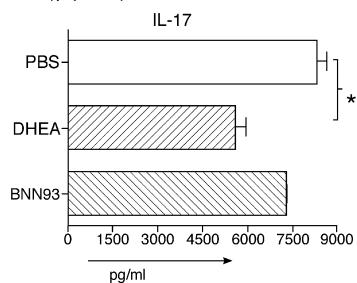
【図 2 6】



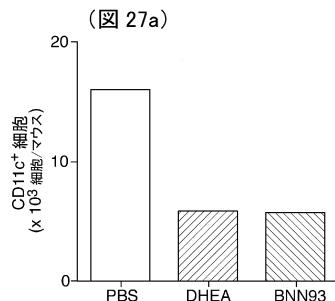
(図 26b)



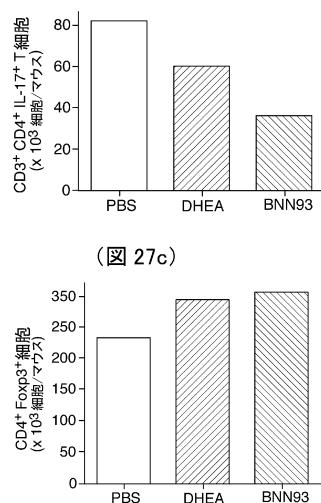
(図 26c)



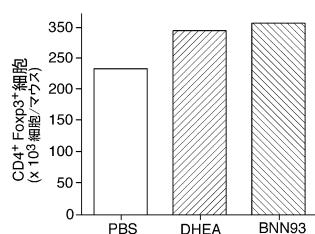
【図 2 7】



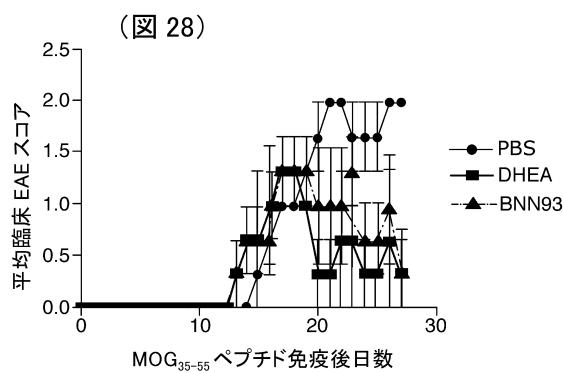
(図 27b)



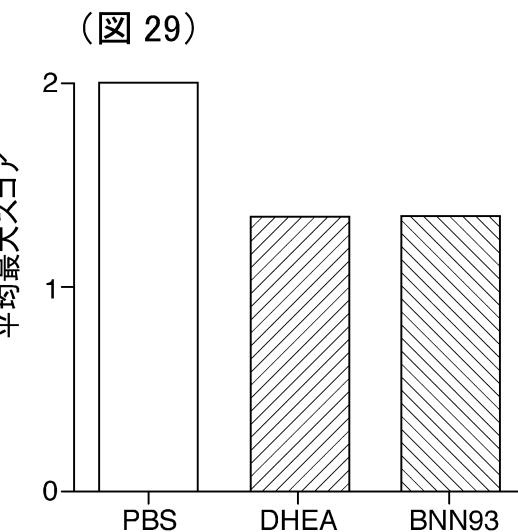
(図 27c)



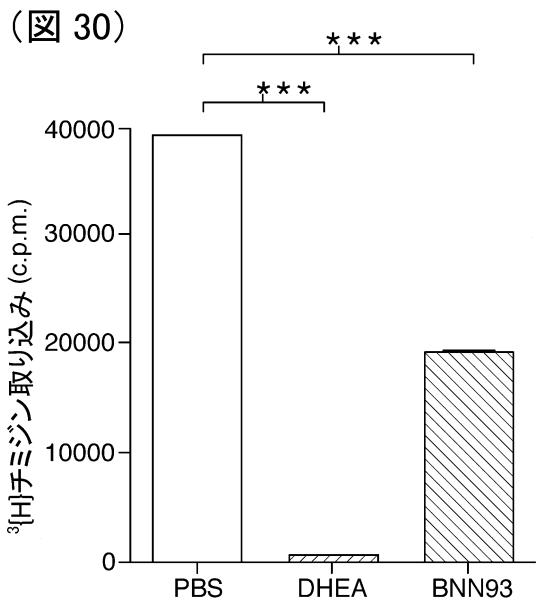
【図 2 8】



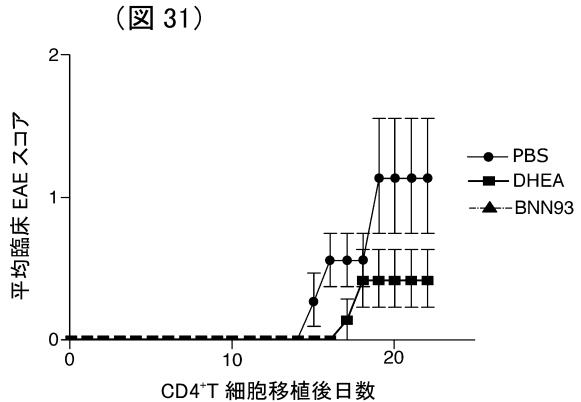
【図 2 9】



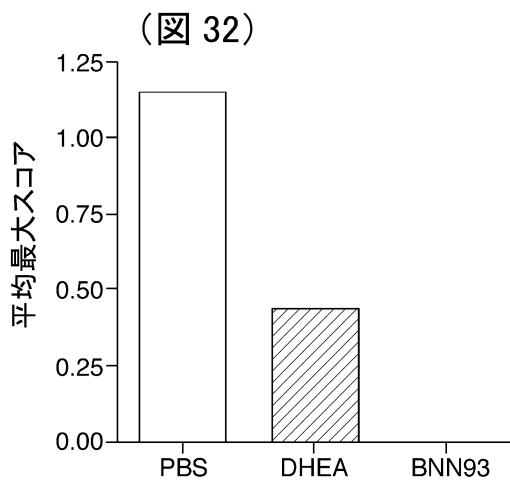
【図 3 0】



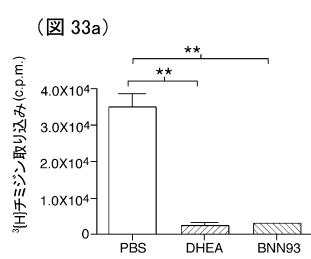
【図 3 1】



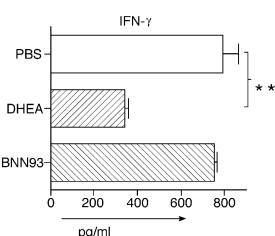
【図 3 2】



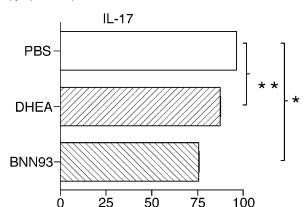
【図 3 3】



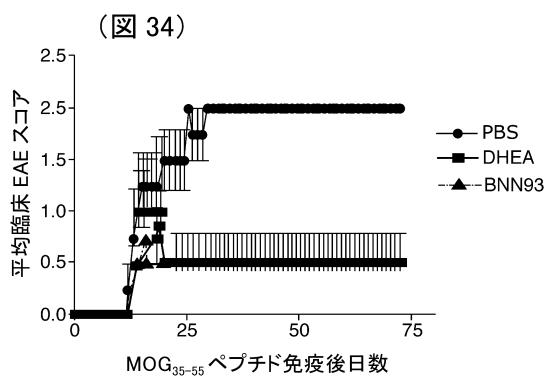
(図 33b)



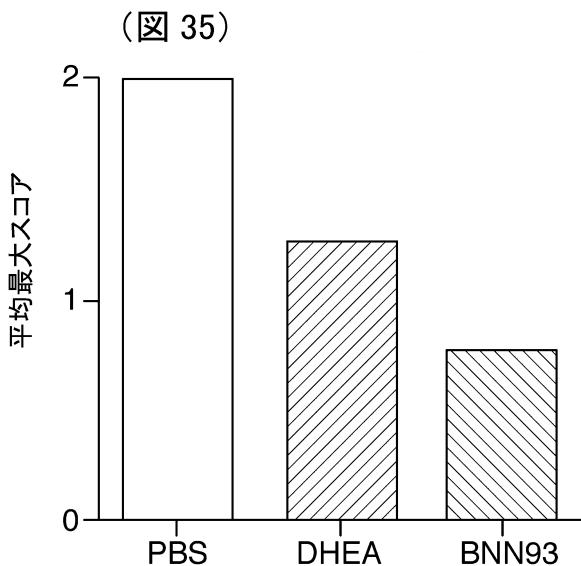
(図 33c)



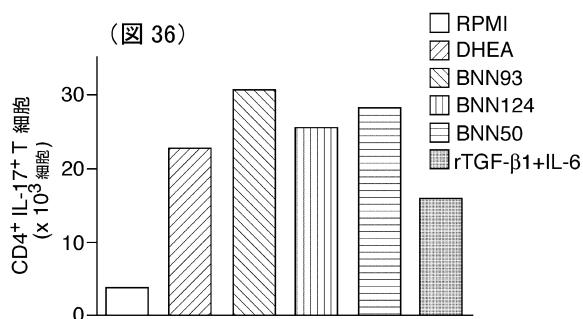
【図34】



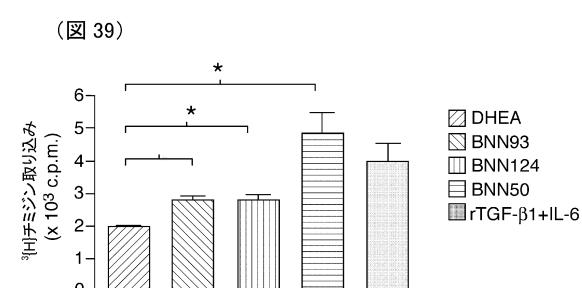
【図35】



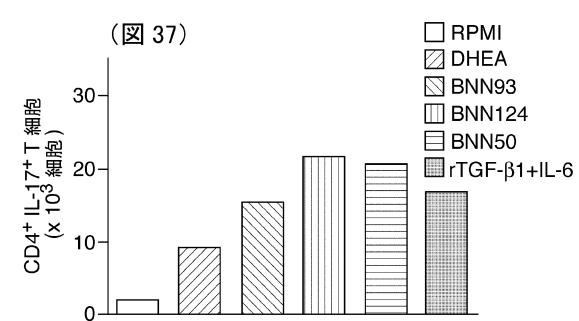
【図36】



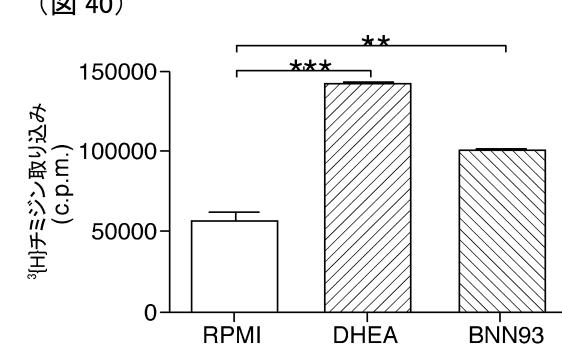
【図39】



【図37】

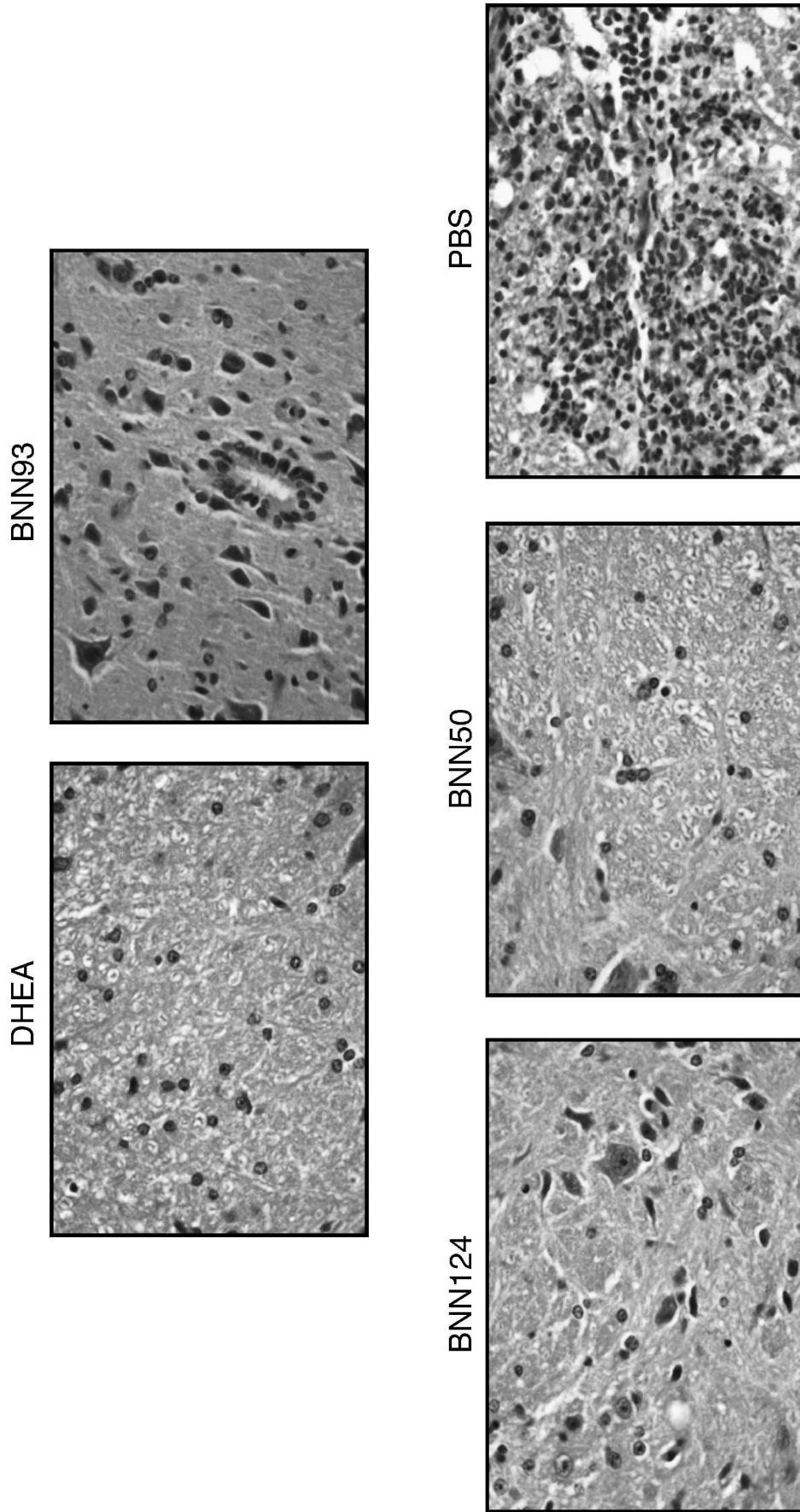


【図40】



【図8】

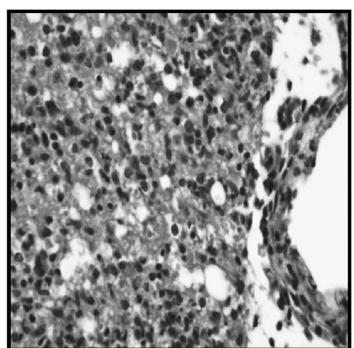
(図8)



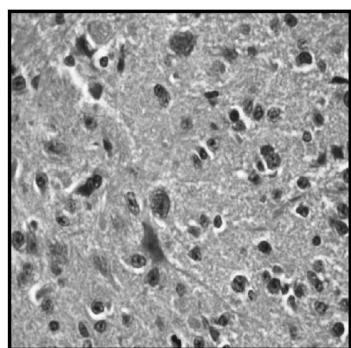
【図18】

(図18)

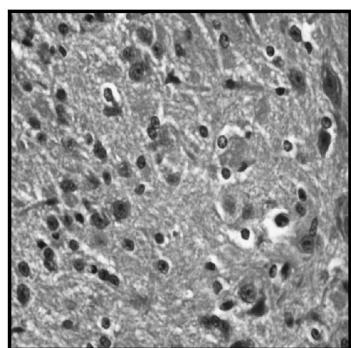
PBS



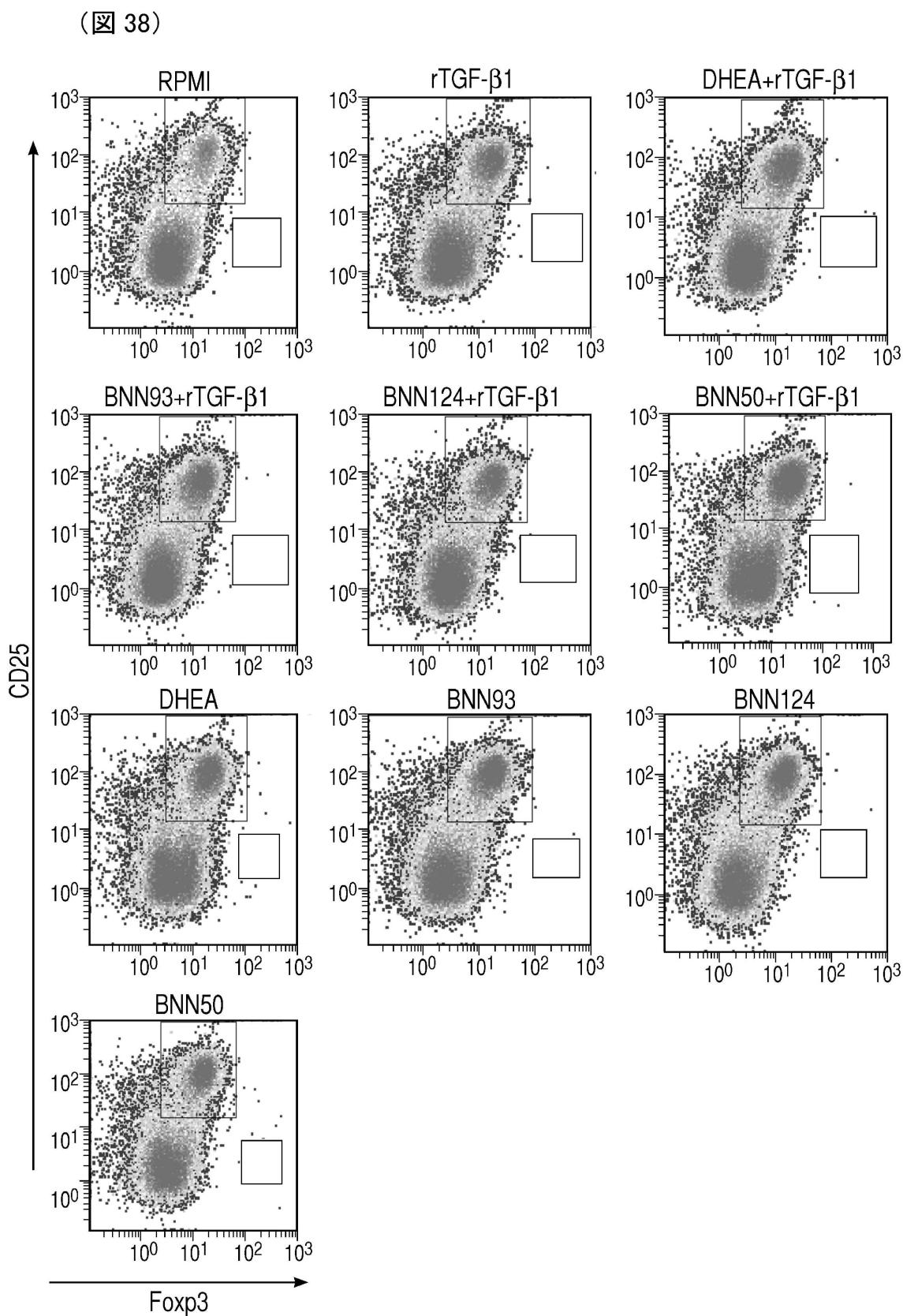
DHEA



BNN93



【図38】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	37/06	(2006.01) A 6 1 P 37/06
A 6 1 P	19/02	(2006.01) A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	3/10	(2006.01) A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	1/04	(2006.01) A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	1/00	(2006.01) A 6 1 P 1/00
A 6 1 P	1/16	(2006.01) A 6 1 P 1/16
A 6 1 P	17/06	(2006.01) A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	17/00	(2006.01) A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	7/06	(2006.01) A 6 1 P 7/06
A 6 1 P	21/04	(2006.01) A 6 1 P 21/04
A 6 1 P	5/14	(2006.01) A 6 1 P 5/14

(72)発明者 キャロゲロポウロウ， セオドラ  
ギリシャ共和国 ジーアール- 1 4 5 6 4 キフィッシア， プロテウス ストリート 3 2  
(72)発明者 グラヴァニス， アチルレアス  
ギリシャ共和国 クレタ ジーアール- 7 1 3 0 5 ヘラクリオン， アトシパドン ストリート 7 エー  
(72)発明者 ラザリディス， ラコヴォス  
ギリシャ共和国 ジーアール- 1 6 6 7 1 アテネ， ヴォウリアグメニ， タリアス ストリート 2 2  
(72)発明者 ネオフィトウ， コンスタンチノス  
キプロス 2 0 5 4 ニコシア， ストロヴォロス， アギオス ドロセオス ストリート 1

審査官 田村 直寛

(56)参考文献 特開平11-124393 (JP, A)  
国際公開第2008/155534 (WO, A1)  
国際公開第2006/007312 (WO, A1)  
国際公開第2007/103162 (WO, A1)  
Int. J. Devl Neuroscience, 1999年, Vol.17, No.8, pp.765-775

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 3 1 / 0 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )