

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07J 41/00

A61K 31/57



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97180284. X

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1142939C

[22] 申请日 1997. 10. 2 [21] 申请号 97180284. X

[30] 优先权

[32] 1996. 10. 4 [33] IT [31] MI96A002048

[86] 国际申请 PCT/EP97/05426 1997. 10. 2

[87] 国际公布 WO98/15568 英 1998. 4. 16

[85] 进入国家阶段日期 1999. 6. 3

[71] 专利权人 尼科克斯公司

地址 法国巴黎

[72] 发明人 P·德索尔达托

审查员 曾武宗

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

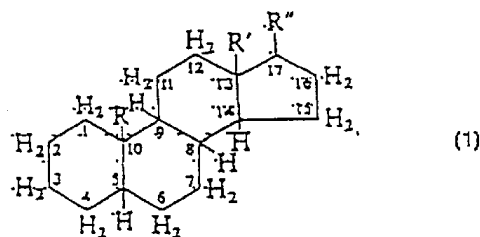
代理人 吴玉和 王其灏

权利要求书 4 页 说明书 19 页

[54] 发明名称 类皮质激素化合物的硝酸酯及其药物应用

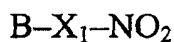
[57] 摘要

通式 $B - X_1 - NO_2$ 的化合物或其酯类或盐类, 其中 B 具有结构(1), 在(1)中可以有取代基取代通式中所示的 CH 基中的氢 H 或 CH_2 基中的二个氢 H_2 ; R 和 R' 可彼此相同或不同并可以为氢或具有 1 到 4 个碳原子的直链或支链烷基, 优选 $R = R' = CH_3$; B 为皮质甾类基; R'' 为 $-(CO-L)_t - (X)_{t_1} -$, 其中 t 和 t_1 为整数, 彼此相等或不同, 并且等于 0 或 1; 其中 L 为二价连接基团; X 相等于 X_0 , 而 $X_0 = O, NH, NR_{1c}$, 其中 R_{1c} 为具有 1 到 10 C 原子的直链或支链烷基; 或等于 X_2 , 其中 X_2 等于 OH, $CH_3, Cl, N(-CH_2 - CH_3)_2, SCH_2F, SH$; X_1 为二价连接的桥 YO, 其中 Y 为 $C_1 - C_{20}$ 亚烷基。



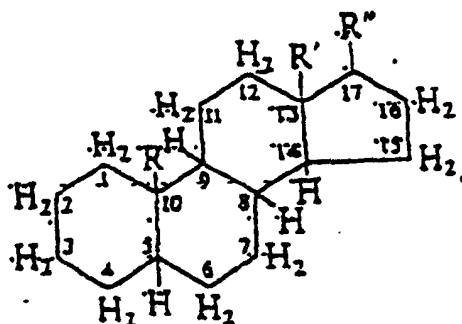
ISSN 1008-4274

1. 如下通式的化合物:



或其酯或盐, 其中:

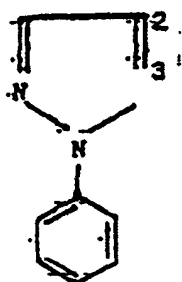
5 B 具有如下结构:



其中, 取代通式中所示的 CH 基中的氢 H 或 CH₂ 基中的二个氢 H₂ 的取代基可如下:

在第 1-2 位: 可以是双键;

在第 2-3 位: 可以是如下取代基;



10

在第 2 位: 可以是 Cl, Br;

在第 3 位: 可以是 CO, -O-CH₂-CH₂-Cl, OH;

在第 4-5 位: 可以是双键;

在第 5-6 位: 可以是双键;

15

在第 6 位: 可以是 Cl, F, CH₃, -CHO;

在第 7 位: 可以是 Cl;

在第 9 位: 可以是 Cl, F;

在第 11 位: 可以是 OH, CO, Cl;

在第 16 位: 可以是 CH₃, OH, =CH₂;

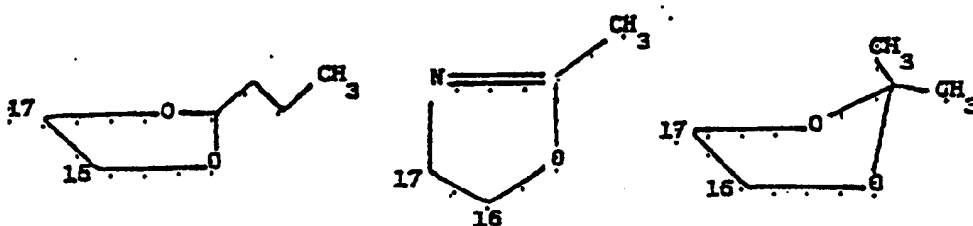
20

在第 17 位: 可以是 OH, CH₃, OCO(O)_{ua}(CH₂)_{va}CH₃, 或



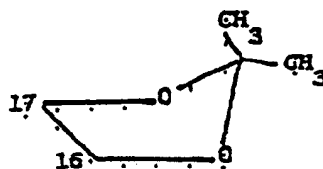
其中 ua 为 0 或 1 的整数, va 是 0 至 4 的整数;

在第 16 - 17 位置: 可以是下述基团;



R 和 R' 相等或彼此不同, 并且可以为氢或具有 1 至 4 个碳原子的直链或支链烷基;

当在 9 位有 F , 在 11 位有 OH , 在 1 - 2 位和 4 - 5 位有二个双键, 在 3 和 20 位有二个基团 CO , 在 16 和 17 位不可能有基团:



B 为皮质甾类基团;

R'' 为 $-(CO-L)_t-(X)_{tl}-$

其中 t 和 tl 为整数, 等于 1,

二价桥基团 L 选自:



15

其中 na , $n'a$ 和 $n''a$ 相等或彼此不同并为 0 至 6 的整数; nb , nb' , $n''b$ 和 $n'''b$ 相等或彼此不同, 并为 0 或 1 的整数; R_4 或 R_5 相等或彼此不同并且选自 H , 具有 1 至 5 个碳原子的直链或支链烷基;

X 相等于 X_0 , 其中 $X_0 = O, NH, NR_{1C}$, 其中 R_{1C} 为具有 1 到 10 个 C 原

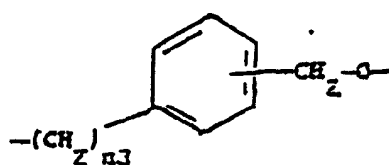
子的直链或支链烷基;

X_1 为二价连接的桥, 选自:

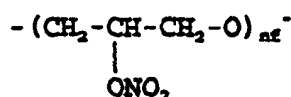
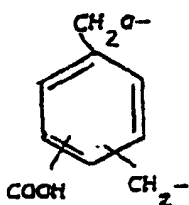
- YO

其中 Y 为直链的或者当有可能时为支链 $C_1 - C_{20}$ 亚烷基, 或可任意取代的具有 5-7 个碳原子的亚环烷基;

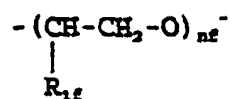
- Y_1 选自



其中 n_3 为 0~3 的整数;



10 其中 nf 为 1 至 6 的整数;



其中 $R_{1f} = H, CH_3$ 和 nf 为 1 至 6 的整数。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 $R=R'=CH_3$ 。

3. 权利要求 1 的化合物, 其中 B 包括下述, 其中 H_2, H, R, R', R'' 具有下面所列的化合物所定义的含义; 布地奈德, 氢化可的松, 阿氯米松, 阿尔孕酮, 倍氯米松, 倍他米松, 氯泼尼松, 氯倍他索, 氯倍他

松, 氯可托龙, 氯泼尼醇, 可的松, 可的松龙, 地夫可特, 地奈德, 去羟米松, 地塞米松, 二氯拉松, 二氯可龙, 二氯泼尼酯, 氟扎可特, 氟氯奈德, 氟米松, 氟尼缩松, 氟轻松, 醋酸氟轻松, 丁基氟可丁, 氟可龙, 氟米龙, 氟培龙醋酸酯, 氟泼尼定醋酸酯, 氟泼尼松龙, 氟氢缩松, 5 福莫可他, 哈西奈德, 卤倍他索丙酸酯, 卤米松, 卤泼尼松醋酸酯, 氢可他酯, 氯替泼诺, 甲羟松, 甲泼尼松, 甲泼尼松龙, 莫米松糠酸酯, 帕拉米松, 泼尼卡酯, 泼尼松龙, 泼尼松龙 25-二乙基氨基醋酸酯, 泼尼松龙磷酸钠, 泼尼松, 强的松龙戊酸酯, 泼尼立定, 利美索龙, 曲安西龙, 曲安奈德, 21-乙酰氧基孕烯诺龙, 可的伐唑, 安西奈德, 氟替卡松丙酸酯, 10 马泼尼酮, 替可的松, 曲安西龙六缩丙酮, 其中 R"如权利要求 1 中所定义的。

4. 一种类皮质激素药物组合物, 其中含有权利要求 1-3 任一项的化合物。
5. 权利要求 1-3 任一项的化合物在制备类皮质激素药物中的应用。
- 15 6. 权利要求 1-3 任一项的化合物在制备抗关节炎剂药物中的应用。
7. 权利要求 1-3 任一项的化合物在制备免疫抑制剂药物中的应用。
8. 权利要求 1-3 任一项的化合物在制备血管生成抑制剂药物中的应用。
9. 权利要求 1-3 任一项的化合物在制备平喘剂药物中的应用。
- 20 10. 权利要求 1-3 任一项的化合物在制备治疗皮肤病学疾病的药物中的应用。
11. 权利要求 1-3 任一项的化合物在制备治疗眼科疾病的药物中的应用。
12. 权利要求 1-3 任一项的化合物在制备治疗肠疾病的药物中的应用。
- 25 用。

类皮质激素化合物的
硝酸酯及其药物应用

5

本发明涉及制备新的类皮质激素化合物。

具体地说，它涉及到具有抗炎，免疫抑制和血管生成抑制（Angiostatic）活性的甾体结构化合物（即所谓的甾体抗炎药物）。

10 本发明的化合物在一般应用皮质甾类（类皮质激素）制剂治疗的病理状态中，在治疗上是有用的，而且有更多的好处。

这表明它要比已知的皮质类激素产品具有意想不到的优点。事实上，通过考虑某一具体产品的各种规定的治疗用途，用本发明的新产品，总是有可能找到要比已知的类皮质激素有更好结果的组合。与任何预期相反，本发明的产品的特征在于，事实上它们表现出改善的治疗性
15 能：高的活性加上低的副作用。

众所周知，类皮质激素在治疗炎症疾病中是作为首选的药理措施。该类别的药物包括，例如氢化可的松，可的松，泼尼松龙，泼尼松，氟氢可的松，去氧皮质酮，甲基泼尼松龙，曲安西龙，帕拉米松，倍他米松，地塞米松，曲安奈德，氟轻松，倍氯米松，乙酰氧基孕烯诺龙等，
20 对各种器官具有显著的药理学作用。由于这个原因，它们的临床应用以及停止应用造成了一系列的副作用。其中一些还非常严重。例子见 Goodman & Gilman “治疗剂的药理学基础”，第9版，1459 - 1465 页，1996。

这些毒性作用包括：

- 25 — 在骨上的毒性作用导致细胞代谢的改变和高发生率的骨质疏松；
— 对冠状血管系统的毒性作用引起高血压反应；
— 对胃肠道的毒性作用造成胃损伤。

例子见 Martindale: “The Extrapharmacopoeia”（“超”药典），第30版，712 - 723 页，1993。

30 按照上面所述技术，要将治疗活性与副作用相分离似乎是几乎不可能的，见 Goodman 等，如上述，1474 页。

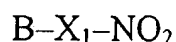
在本技术领域已知的为非甾体抗炎药物，带有或不带有酸性末端，对非酸性末端见专利 WO 94/04484，WO 94/12463，WO 95/09831，WO 95/30641，而这些专利其中也提及那些带有酸性末端的药物。

- 5 然而，应注意的是甾体化合物在化学上完全是不同于非甾体化合物，而在药理学和生物化学上，作为非甾体产品的药理-毒理学作用机制是基于抑制一个或多个环氧合酶（COX），而甾体产品则根本不涉及 COX 并且有更复杂的药理-毒理学作用机制，它们还尚未被充分阐明。

- 10 这二组化合物已周知在世界药典中分类在完全分开的类别中。

本申请人惊奇和意料之外地发现皮质甾类（类皮质激素），它们非常有效，甚至优于在已知领域中的那些品种，并要比已知的皮质甾类同时具有更好的耐受性，因为使人感到预料之外的是，它们不引起上述的副作用，或者即便有这些副作用也要更低些。

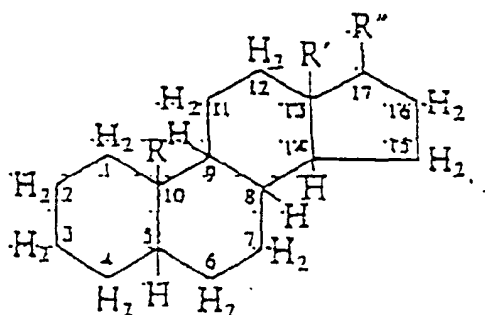
- 15 本发明的目的是皮质甾类及其用作为抗炎，免疫抑制和血管生成抑制剂，具有如下通式：



或其酯或盐，其中：

B 具有如下结构：

20

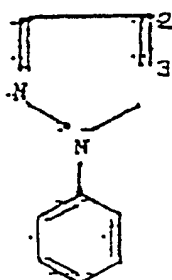


25

其中，取代通式中所示的 CH 基中的氢 H 或 CH₂ 基中的二个氢 H₂ 的取代基可如下：

- 30 在第 1 - 2 位：可以是双键；
 在第 2 - 3 位：可以是如下取代基；

5



10

在第2位: 可以是 Cl, Br;

在第3位: 可以是 CO, $-O-CH_2-CH_2-Cl$, OH;

在第4-5位: 可以是双键;

在第5-6位: 可以是双键;

在第6位: 可以是 Cl, F, CH_3 , $-CHO$;

在第7位: 可以是 Cl;

在第9位: 可以是 Cl, F;

15

在第11位: 可以是 OH, CO, Cl;

在第16位: 可以是 CH_3 , OH, $=CH_2$;

在第17位: 可以是 OH, CH_3 , $OCO(O)_{ua}(CH_2)_{va}CH_3$, 或

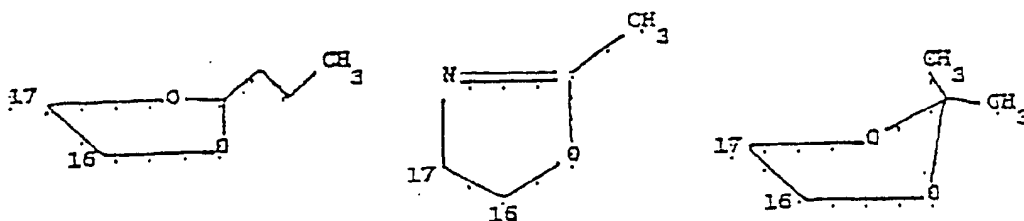
20



其中 ua 为 0 或 1 的整数, va 是 0 至 4 的整数;

在第16-17位置: 可以是下述基团;

25



30

R 和 R' 相等或彼此不同, 并且可以为氢或具有 1 至 4 个碳原子的直链或支链烷基, 优选 $R=R'=CH_3$;

B 为皮质甾类基团;

R'' 为 $-(CO-L)_t-(X)_{tl}-$

其中 t 和 tl 为整数, 相同或彼此不同并且等于 0 或 1, 其条件是当 B 不含 -OH 基时, 它们不能同时为 0;

5 二价桥基团 L 选自:



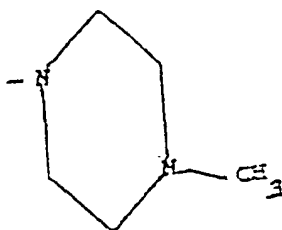
其中 na, n'a 和 n''a 相等或彼此不同并为 0 至 6 的整数, 优选从 1 至 3;

10 nb, nb', n''b 和 n'''b 相等或彼此不同, 并为 0 或 1 的整数; R₄ 或 R₅ 相等或彼此不同并且选自 H, 具有 1 至 5 个优选从 1 至 3 个碳原子的直链或支链烷基;

X 相等于 X₀ 其中 X₀ = 0, NH, NR_{1C}, 其中 R_{1C} 为具有从 1 到 10 C 原子的直链或支链烷基; 或相等于 X₂, 其中 X₂ 相等于 OH, CH₃,

15 Cl, N(-CH₂-CH₃)₂, -SCH₂F, SH,

20



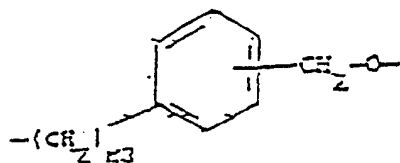
X₁ 为二价连接的桥, 选自:

- YO

25 其中 Y 为直链的或者当有可能时为支链 C₁ - C₂。亚烷基, 优选含有 2 至 5 个碳原子, 或可任意取代的具有 5 - 7 个碳原子的亚环烷基;

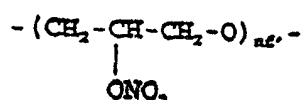
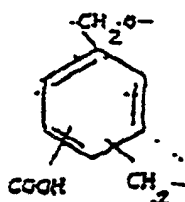
- Y₁, 选自

30



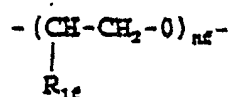
其中 n_3 为 0~3 的整数;

5



10

其中 n_4 为 1 至 6 的整数, 优选 2~4;



15 其中 $\text{R}_{1f} = \text{H}, \text{CH}_3$ 和 n_5 为 1 至 6 的整数, 优选 2~4.

可以提及的优选的化合物为下面所列的那一类, 其中 B 可以按本领域的已知方法得到.

例如, 在 Merck Index, 12 版, 1996 (在此列入作为参考文献) 并作为例子所述的前体和相关方法可被提及作为前体或有关的方法. 这些前体 (按 Merck 命名) 包括下述, 其中 $\text{H}_2, \text{H}, \text{R}, \text{R}', \text{R}''$ 具有下面所列的化合物所定义的含义; 布地奈德, 氢化可的松, 阿氯米松, 阿尔孕酮, 倍氯米松, 倍他米松, 氯泼尼松, 氯倍他索, 氯倍他松, 氯可托龙, 氯泼尼醇, 可的松, 可的松龙, 地夫可特, 地奈德, 去羟米松, 地塞米松, 二氟拉松, 二氟可龙, 二氟泼尼酯, 氟扎可特, 氟氯奈德, 氟米松, 氟尼缩松, 氟轻松, 醋酸氟轻松, 丁基氟可丁, 氟可龙, 氟米龙, 氟培龙醋酸酯, 氟泼尼定醋酸酯, 氟泼尼松龙, 氟氢缩松, 福莫可他, 哈西奈德, 卤倍他索丙酸酯, 卤米松, 卤泼尼松醋酸酯, 氢可他酯, 氯替泼诺 (Loteprednol etabonate), 甲羟松, 甲泼尼松, 甲泼尼松龙, 莫米松糠酸酯, 帕拉米松, 泼尼卡酯, 泼尼松龙, 泼尼松龙 25 - 二乙基氨基醋酸酯, 泼尼松龙磷酸钠, 泼尼松, 强的松龙戊酸酯, 泼尼立定, 利美索龙, 曲安西龙, 曲安奈德, 21 - 乙酰氧基孕烯诺龙, 可的伐唑, 安西奈德, 氟替卡松丙酸酯, 马泼尼酮, 替可的松, 曲安西龙六缩丙酮.

20

25

30

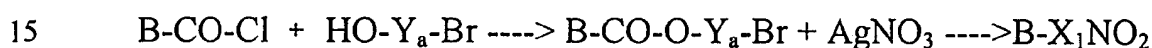
如上述定义的 X_1 连接桥可应用如上面所述技术领域中的已知的方法得到, 或者通过修改已知的方法, 应用本领域中已知的方法而引入 X_1 桥 (当所列的专利中描述的连接桥为不同时)。B 和 X_1 的连接一般为, 如见到的, 酯或酰胺类型 (如 X 中所定义的 NH 或 NR_{1C})。任何熟知的可形成这些键的合成途径均可用于形成这种连接。

在酯的情况下, 最直接的合成途径包括: 将酰氯 $BCOCl$ 在 $HO-Y_a-Cl$, $HO-Y_a-Br$, $HO-Y_a-I$ 类型的卤醇中 (其中 Y_a 等于 Y 或 Y_1 而不带有氧原子) 在试验条件下 (这是已知技术领域的一部分) 反应。

式 $BCO-O-Y-Cl$ (Br, I) 的反应产物也可通过将酸 $BCO-OH$ 的钠或钾盐与通式 Y_aCl_2 , Y_aBr_a , 或 Y_aI_2 , ClY_aBr , BrY_aI , ClY_aI , BrY_aI 的二卤衍生物反应而得到。

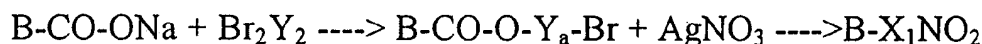
反应产物可按文献中已知的方法通过与 $AgNO_3$ 在乙腈中反应而被转变成最终产物。

一般反应式如下:



其中 $X_1 = Y_aO$ 。

一般反应式也可如下:



其中 $X_1 = Y_aO$ 。

在酰胺的情况下, 合成的顺序包括将相同的酰氯 $BCOCl$ 与通式 NH_2-Y_a-OH , $NHR_{1C}-Y_a-OH$ 的氨基醇按照已知的方法的反应, 给出如下通式的酰胺。

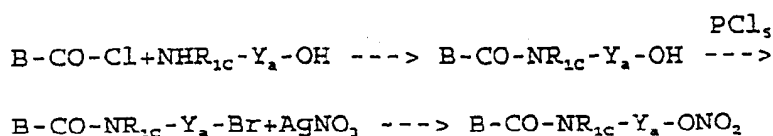


这些酰胺与卤化剂, 例如 PCl_5 , PBr_3 , $SOCl_2$ 等的反应, 给出如下通式的卤素衍生物:



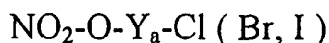
按照文献中已知的方法, 后者通过与 $AgNO_3$ 在乙腈中的反应, 给出最终产物 BX_1NO_2 。

所述顺序可如下表示:



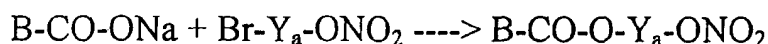
5 其中 Y_aO 为 X_1 。

酯形成的另外一个途径是将酸的钠或钾盐与如下通式的卤醇的硝酸酯反应：



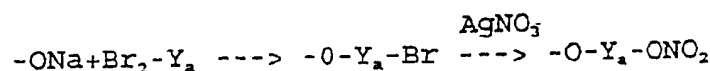
直接给出本发明的产物。

10 反应式如下：



其中 Y_aO 为 X_1 。

其他的相似于上述的合成途径包括其中二卤素衍生物 Br_2Y_a 与烯醇物反应的那些。反应产物然后按上述的反应通过在乙腈中与 AgNO_3 反应而被转变。对基团 B 中的 -OH (如类型 $\text{-CH}_2\text{-OH}$, =CH-OH)，一般的反应式表示如下：



20 得到这些 X_1 连接基团的方法描述在专利申请 WO 95/30641 中，该申请在此列为参考文献。

如上述，式 $\text{B-X}_1\text{-NO}_2$ 的本发明的化合物或其药物组合物，被用于治疗那些其中使用熟知的类皮质激素的疾病。

特别是，可被具体提及的是用于治疗呼吸紊乱，如哮喘，用作为抗关节炎，止痒，抗牛皮癣，抗湿疹，用于血管疾病，如血管生成抑制，用于免疫疾病，如免疫抑制。

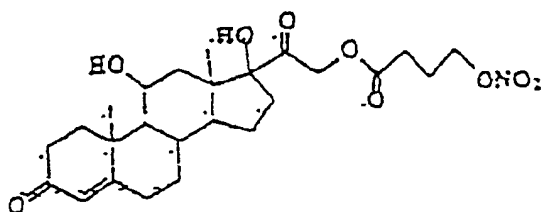
本发明的化合物，或其组合物可被如下给药：例如口服，直肠（肠道疾病），非胃肠道或通过局部（皮肤，局部，透皮，眼内，吸入等施用）。

30 给出下面的实施例仅作为解释用的阐明目的，但并非用作为限制本发明。

实施例 1

化学合成: 氢化可的松硝基衍生物 (HCN) 的制备

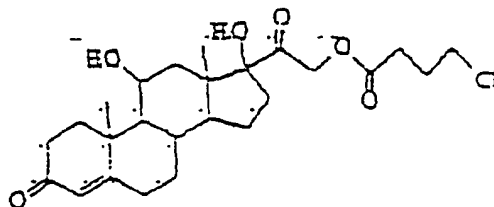
5



10 实施例 IA:

氢化可的松 (4 - 氯) 丁酸酯的制备

15



将 4 份 4 - 氯丁酰氯 (0.32 ml×4) 和三乙胺 (0.3 g×4) 于 24 小时内加入至用 P₂O₅ 干燥的氢化可的松 (1 g) 在 CHCl₃ 的溶液中并搅拌 3 天。溶液用水处理, 分出有机相, 干燥 (Na₂SO₄) 并在减压下除去溶剂。用己烷和 CH₂Cl₂ 研磨粗残余物, 得到 53 % 重量收率的白色固体, 熔点为 155 °C。

用质谱鉴定产品: M⁺493。

25

¹H NMR (300 MHz CDCl₃): 0.95 (3H, s, CH₃), 1.45 (3H, s, CH₃), 2.12 (2H, t, CH₂ in 2), 2.6 (2H, t, CH₂COO), 3.65 (2H, t, CH₂Cl), 4.45 (1H, m, CHOH), 4.35 and 5.05 (2H, 2d, COCH₂O), 5.70 (1H, s, 烯烃 H)。

30

氢化可的松 (4 - 硝酰基) 丁酸酯的制备

将 AgNO₃(0.2 g) 加入至如上述制备了的氢化可的松 4 - 氯丁酸酯

(0.23 g) 在乙腈 (70 ml) 的溶液中并回流 16 小时。将溶液于减压下除去溶剂并于硅胶上进行柱层析, 用乙酸乙酯和 CH_2Cl_2 (3:7) 为洗脱剂。

从头几份洗脱液回收可的松 4 - 硝酰基丁酸酯。

5 用 ^1H NMR (300 MHz CDCl_3) 鉴定产物:

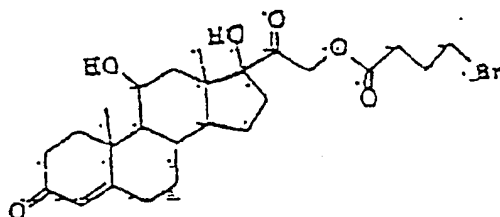
0.95 (3H, s, CH_3), 1.45 (3H, s, CH_3), 2.12 (2H, t, CH_2 in 2), 2.6 (2H, t, CH_2COO), 4.45 (1H, m, CHOH), 4.45 (2H, t, $\text{CH}_2\text{O}-\text{NO}_2$), 4.35 和 5.05 (2H, 2d, COCH_2O), 5.68 (1H, s, 烯烃 H)。

10

实施例 IB

应用其他的合成途径也制备了实施例 IA 产物
氢化可的松 4 - 溴丁酸酯的制备

15



20

将 5 份 4 - 溴丁酰氯 (0.35 ml $\times$ 5) 和碳酸钾 (0.4 g $\times$ 5) 于 24 小时内加入至用 P_2O_5 干燥的氢化可的松 (1 g) 在 CHCl_3 的溶液并搅拌 5 天。用水处理溶液, 分离有机相, 干燥 (Na_2SO_4) 并于减压下除去溶剂。

25 氢化可的松 4 - 硝酰基丁酸酯(HCN)的制备

将 AgNO_3 (0.2 g) 加入至如上述制备的氢化可的松 4 - 溴丁酸酯 (0.23 g) 在乙腈 (70 ml) 的溶液中并于室温搅拌 48 小时。

将溶液于减压下除去溶剂并于硅胶下进行色谱层析, 用乙酸乙酯和 CH_2Cl_2 (3:7) 溶液作为洗脱剂。

30 从头几份洗脱液回收可的松 4 - 硝酰基丁酸酯并用质谱鉴定: $\text{M}^+ 493$ 。波谱与实例 IA 所示的相同。

实施例 2

安全性和活性的评价

在体内试验中产品是以在 2 % (重量比) 的羧甲基纤维素混悬液中给药的, 而体外研究是用 0.1% (重量比) 的二甲基亚酸混悬液。

- 5 试验组总是包括 8 个试样 (除非在实施例中另有说明) 以进行适宜的统计学评价, 当需要时可按照通常的统计学方法进行。

实施例 2A

急性毒性研究

- 10 实施例 1A 的产品的急性毒性是通过对一组 10 只瑞士种小鼠口服给药一次剂量的物质进行粗测的。

在给药化合物后 14 天期间, 观察发生死亡和毒性症状的出现。

即使给药 50 mg/kg 剂量后, 动物也未出现任何明显的毒性指征。

实施例 2B

抗关节炎活性的研究

- 15 通过将 0.6 mg 乳酪分支杆菌 (Difco) 在 0.1 ml 的矿物油中的混悬液对重量为 170 + 15 g 的 Lewis 种雄性大鼠进行尾内 (intracaudal) 注射以诱发佐药关节炎。然后这些动物如下处理: 从分支杆菌接种后的第一天始, 腹膜内注射用 2 % (重量比) 的羧甲基纤维素在水中的混悬液配制成的赋形剂, 腹膜内注射剂量为 5 mg/kg 或 10 mg/kg 的 HCN 的氢
20 化可的松 (如上所述的混悬液)。

21 天后评估关节炎的发展。对关节的损伤按下述等级规定了人为的评分:

- 后肢: 各为 0 到 7 (0 为无损伤而 7 为最严重的损伤);
— 前肢: 各为 0 至 4.5 (0 为无损伤而 4.5 为最严重的损伤);
25 — 尾: 0 至 5 (0 为无损伤而 5 为最严重的损伤);
— 耳: 各为 0 至 2 (0 为无损伤而 2 为最严重的损伤);
— 鼻和眼: 各为 0 至 1 (0 为无损伤而 1 为最严重的损伤)。

与对照组 (仅用赋形剂处理的动物) 所得的数值相比较后, 结果是以抑制率的百分数来表示。

- 30 结果示于表 1 中。

表 1. 在大鼠中化合物 HCN 对比氢化可的松
的抗关节活性的研究

化合物	剂量 (mg/kg)	抗关节炎活性 (%)
氢化可的松	5	40
氢化可的松	10	55
HCN	5	45
HCN	10	62

如表 1 中的结果所示, 试验化合物具有相似的能力以抑制由分支杆
5 菌引起的关节炎过程的发展。然而, 由于 HCN 的耐受性要远优于氢化
可的松 (见下面的实施例 2C), 就活性而言, HCN 的结果要好得多。
(见用 5 mg/kg 氢化可的松所得的 40 % 的抗关节炎活性对比用 10
mg/kg HCN 所得的 62 %)

实施例 2C

10 胃耐受性 (安全性) 的研究

禁食 24 小时的雄性 Sprague-Dawley 大鼠腹膜内注射 5 至 10 mg/kg
的氢化可的松或 HCN。

24 小时后处死动物, 切除胃并按 Del Soldato 等所述宏观检查组织
存在的损伤。“禁食和西咪替丁对西咪替丁的致溃疡和抗炎性质之间
15 的关系的影响”, Br. J. Pharmacol. 67, 33-37, 1979。疾病的严重程度是
按普通方法评价的并以人为的数值表示。结果示于表 2 中。

表 2. 在大鼠中化合物 HCN 对比氢化可的松
的胃耐受性的研究

化合物	剂量(mg/kg)	胃的耐受性
氢化可的松	5	2.0
氢化可的松	10	3.5
HCN	5	0.5 [*]
HCN	10	1.2 [*]

数据是按下述等级以人为的数值表示的：0 = 不存在；1 = 轻度损伤；2 = 中度损伤；3 = 点状的溃疡；4 = 严重和无数的溃疡。

* $P < 0.05$ （其中 P 为或然率）与用氢化可的松处理的组中相应的数值相比较。

- 5 如表 2 所示，用氢化可的松处理的大鼠在胃肠道出现明显的疾病，其严重程度从粘膜糜烂到涉及肌肉层，壁粘着，腹水，腹膜炎的溃疡不等。在单用赋形剂或 HCN 处理的其他组中，损伤则要低得多或甚至没有。

实施例 2D

10 硝酰基合成酶活性的研究

- 在大鼠中性白细胞和胃中由脂多糖（LPS）诱导的硝酰基合成酶的抑制活性的测定如下进行：在将待测化合物之一给药后并与仅用混悬的赋形剂处理后所得的结果相比较。在处理前禁食 24 小时的 Wistar 大鼠，然后腹膜内给药待测化合物之一（10 mg/kg）或静脉内给药 LPS
15 （尾静脉）（5 mg/kg）。四小时后处死动物。分离出血的中性白细胞并切除胃。

酶的活性是按 Assreuy 等描述的方法进行测定：“氧化氮对氧化氮合成酶活性的反馈抑制” Br. J. Pharmacol. 108, 833-7, 1993。结果见表 3。

20

表 3 - 在大鼠中化合物 HCN 相对于氢化可的松
对硝酰基合成酶活性的研究

化合物	剂量 (mg/kg/腹膜注射)	硝酰基合成酶的活性 ^a
赋形剂	-	100
氢化可的松	10	55*
HCN	10	62*

^a. 与单用赋形剂处理的组相比较的百分抑制率。

* $P < 0.05$ ，当与用赋形剂处理的组中相应的值相比较。

25

如表 3 所示，二个待测化合物与仅用赋形剂处理的相比较，证实对抑制硝酰基合成酶非常有效。

实施例 2E

骨毒性的研究

- 5 将骨组织（从大鼠胎儿取出顶骨）按 Doherty 等所述的方法在体外生长（糖皮质激素对成骨细胞功能的影响，皮甾酮对成骨细胞的影响， β -I 整联蛋白的表达” Journal of Bone and Joint Surgery, Series A77/3, 396-404, 1995）。氢化可的松或 HCN 或赋形剂是以 100 nmol 浓度孵育的。

96 小时后测定钙含量和骨的干重。

结果示于表 4 中。

10

表 4 - 大鼠中 HCN 和氢化可的松对骨生长的影响。

处理	(nmol)	钙 $\Delta^{\circ}\%$	干组织重 $\Delta^{\circ}\%$
赋形剂	-	310	160
氢化可的松	10	70*	95*
HCN	10	287	149

° 与起始值比较（孵育时间 0）

* $P < 0.05$ 当与对照组（赋形剂）所得值比较时。

- 15 如表 4 所示，在与赋形剂或 HCN 孵育后，可观察到增加的钙和显著增加的组织干重。在用氢化可的松孵育后，钙含量降低而骨干重并未增加。此表明这种用氢化可的松的处理对骨生长有副作用。

实施例 2F

一些心血管指标的研究

- 20 按 Gardiner 等[“在清醒大鼠中地塞米松对区域血流动力学对脂多糖的反应的影响：非选择性内皮素拮抗剂的作用：SB 209670”，Br. J. Pharmacology 117, 49P, 1996]所述，在适当监控的清醒 Long Evans，大鼠（350 至 450 g）中研究了待测产物对一些心血管指标的影响。动物用赋形剂（生理盐水溶液，0.9%氯化钠，皮下注射），氢化可的松或
- 25 HCN 皮下注射（10 mg/kg）处理。在处理 4 小时后记录心率和血压。

表 5 示所得数据，作为对照值的百分变化率。

表 5 - 在大鼠中化合物 HCN 相对于氢化可的松
对一些心血管指标的研究

化合物	剂量(mg/kg)	心率 ^a (%)	血压 ^b
赋形剂	-	100	160
氢化可的松	10	89*	115*
HCN	10	98	103

* P < 0.05, 当与赋形剂处理组比较时

^a 与单用赋形剂的处理组记录的值 (324+7 次心跳/每分钟) 相比较的百分变化率。

^b 与单用赋形剂的处理组记录的值 (101 + 2 mmHg) 相比较的百分变化率。

表 5 的结果表明, 本发明 HCN 产品并不影响测量的心血管指标。

与此相反, 在已知技术中使用的氢化可的松表明有显著的血压和心脏的变化。

实施例 2G

大鼠中血管生成抑制的活性研究

按照 Andrade 等描述的方法使用 180 到 200 g 重的雄性 Wistar 大鼠。Andrade 等在大鼠海绵模型中对血管生成的定量活体研究”, Brit. J. Exp. Pathol. 68, 755-766, 1987。通过在皮下组织植入小海绵 14 天来评估新血管形成与血流的关系和测定 ¹³³Xe 的清除率。简言之, 用小聚乙烯插管向海绵注射入相当于 10 μ l 的 ¹³³Xe 的量。用 γ 射线检测器测量植入的残留放射活性和测定 ¹³³Xe 清除率 6 分钟并以起始值的百分率表示。该测量新血管形成的方法的有效性最近已由 HU 等所表明: “血管生成的大鼠海绵模型中 ¹³³Xe 清除率, 血流量和组织学的关系。血管生成修饰剂的进一步研究”, Lab. Invest. 72, 601-610, 1995。

将待测化合物在植入后从第 1 至第 13 天以 10 mg/kg 的剂量通过皮下途径给药。然后处死动物并记录胸腺和脾的重量。

就试验产物对新血管形成和对脾和胸腺重量的影响所得的数据示于表 6。

表 6 - 在第 14 天 HCN 和氢化可的松对 ^{133}Xe 清除率
和脾及胸腺重量的影响

处理	^{133}Xe (%)	脾(mg)	胸腺(mg)
赋形剂	42	663±25	313±28
氢化可的松	33	642±32	185±17*
HCN	22*	673±38	297±31

* $P < 0.05$, 与对照组 (赋形剂) 所得的值比较。

- 5 显然, HCN 被证明能够起到显著的血管生成抑制作用而不改变脾和胸腺的重量, 这不同于参照的产物。

很明显, 从表 1 至 6 所示的所有数据表明: 硝基衍生物的药效学活性 - 抗关节炎, 免疫抑制和抗血管生成活性 - 和耐受性均要比已知技术领域的类皮质激素要优越。

10 实施例 3

地塞米松 21 - (4 - 溴丁酸酯) [II]

地塞米松[I]	3.5 g	8.9 mmol
4 - 溴丁酰氯	4.06 ml	35 mmol
碳酸钾	4.9 g	35 mmol

- 15 四氢呋喃 70 ml

将化合物 1 在四氢呋喃的溶液于 7 小时内用 4 - 溴丁酰氯 (0.81 ml×5) 和碳酸钾 (0.98 g×5) 分批处理。将混合物搅拌过夜, 减压蒸去溶剂并用乙醚和水处理残余物。分出有机层, 用水洗涤并用无水硫酸钠干燥。在蒸除溶剂后, 用硅胶闪式柱层析纯化残余物, 以叔丁基甲基

- 20 醚己烷 1 - 1 洗脱, 给出:

—— 极性较小的化合物	1.0 g;
—— 衍生物 II	1.5 g (mp 184-187 °C; 收率 31 %)

TLC: 叔丁基甲基醚 - 己烷 2 - 1。

地塞米松 21 - (4 - 硝酰基丁酸酯) [III] (化合物 DXN)

- | | | |
|-----------|--------|-----------|
| 25 化合物 II | 1.5 g | 2.7 mmol |
| 硝酸银 | 2.4 g | 14.1 mmol |
| 乙腈 | 250 ml | |

将化合物 II 和硝酸银在乙腈中的混合物回流 7 小时。过滤无机盐后，于真空下除去溶剂并用乙醚处理残余物。用水洗涤有机层二次，用无水硫酸钠干燥并于真空下蒸发。将残余物倾入至乙醚中并且过滤，得 1.27 g 纯化合物 III，为白色固体（m.p183 - 185 °C；收率 90 %）。

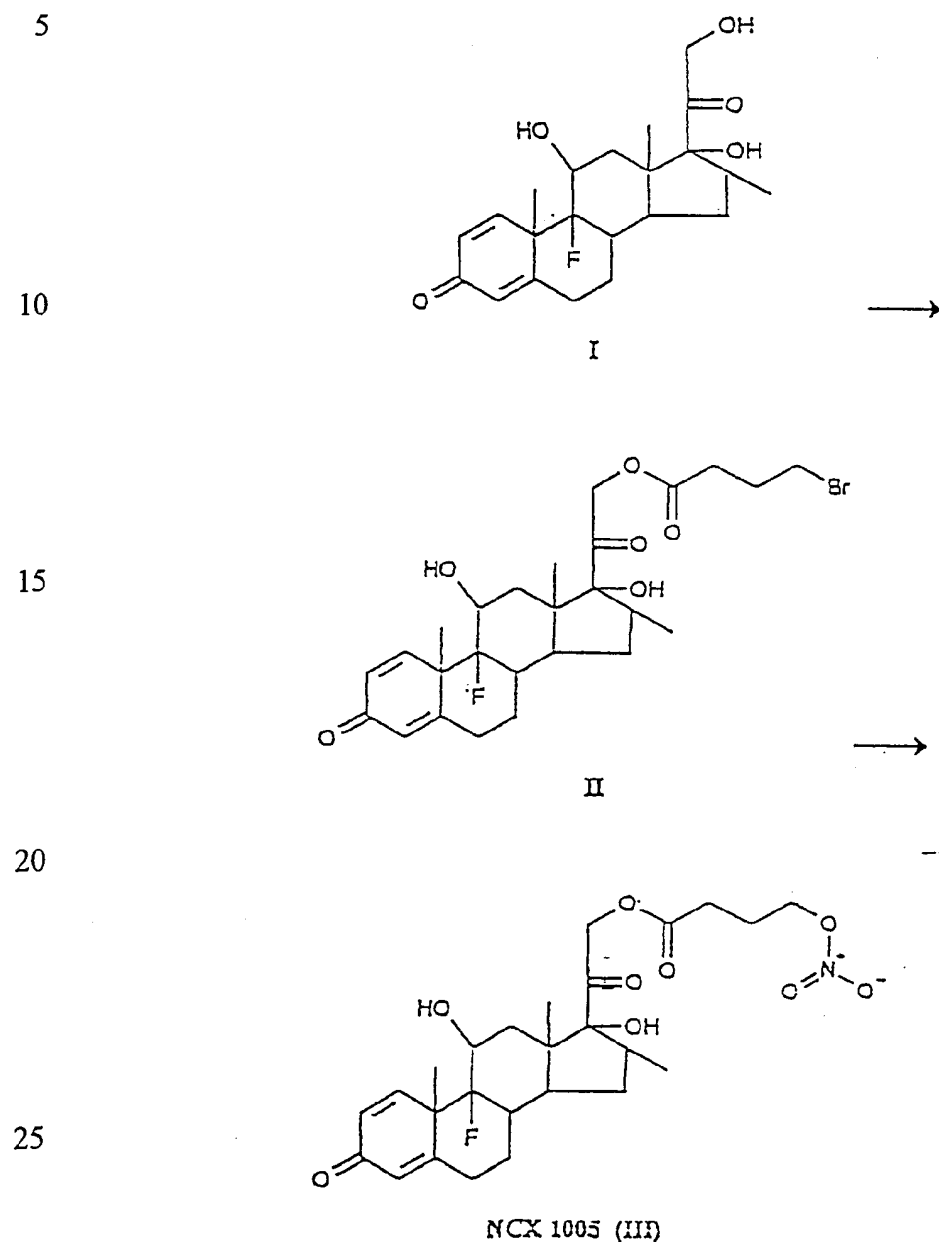
5 TLC：叔丁基甲基醚 - 己烷 2 - 1

下面的表格包括：

- 合成反应式；
- NC×1005 批号 1；
- NC×1005/1 分析。

制备地塞 21 - (4 - 硝基氧丁酸酯) 的合成反应式。

SYNTHETIC SCHEME FOR THE PREPARATION
OF DEXAMETHASONE 21-(4-NITROOXYBUTYRATE)



实施例 4

30 对白细胞积集活性的研究

使用雄性 Swiss albino 小鼠 (27 - 33g), 维持标准的动物颗粒食物并随意饮用自来水。按 Perretti 等 (Perretti M., Solito E., Parente L.,

“在大鼠和小鼠急性实验性炎症中证据表明内源性白介素 - 1 参与了中性白细胞的迁移”， Agents Actions, 35, 71, 1992) 以前描述的方法进行实验。在时间 0 时用酵母聚糖 (1 mg/0.5 ml) 腹膜内注射预处理动物。二小时后将地塞米松 (1 mg/kg) (Ex3-I), DXN (Ex3-III) (1 mg/kg) 或磷酸盐缓冲了的盐水 (PBS) 静脉给药。于 4 和 24 小时处死动物并收集灌洗液，并在 Turk’s 染色后进行分化细胞计数。

表 7 报告了在小鼠中试验化合物对酵母聚糖 - 诱发的白细胞迁移的抑制作用所得的结果。可以看出，硝基衍生物要比地塞米松活性要高得多。

10

表 7 - 在腹膜内注射酵母聚糖 (1 mg/0.5 ml) 2 小时后，
静脉注射地塞米松和 DXN (1 mg/kg) 对中性白
细胞和单核细胞募集的抑制作用：

处理	PMN×10 ⁶ /小鼠 (时间 4 小时)	%减少	单 - mφ×10 ⁶ /小鼠 (时间 24 小时)	%减少
赋形剂	10.1±1.0	----	8.8±1.3	----
DXN	4.5±0.3	55.4	4.5±0.6	48.8
地塞米松	6.4±0.4	36.6	6.3±0.2	28.4

15 实施例 5

人气道平滑肌细胞中抗增殖活性的研究

用标准移植方法培育人气道平滑肌细胞。将组织收集到含有 PBS 和青霉素和链霉素的消毒缸中。在无菌组织培养条件下，将组织切成小块 (约 1 mg 重量) 并放置入至含有 20 % 胎牛血清 (FCS) 的标准培养基中数天 (每 2 - 4 天换培养基) 。测定培养在 48 孔平板中细胞的 DNA 组分中的 ³H - 胸苷。将细胞孵育至融合到含有 10 % FCS 的培养基中。在加入 10 % FCS 以及不同浓度的甾体前，将细胞除去血清 24 小时。24 小时后将 ³H - 胸苷加入至细胞 4 小时。用磷酸盐缓冲的盐水和乙醇洗涤细胞。用氢氧化钠溶液抽提 DNA 并用闪烁仪计数 ³H 物质。代表观察到的数据是从一健康的肺供者培养的平滑肌的三个孔中得出的。表 8 报告了测试化合物对人气道平滑细胞增殖的抑制作用所得的结果。可以看到，硝基衍生物甾体要经地塞米松的活性高得多。

表 8 - 不同浓度的地塞米松和 DXN 对人气道平滑
细胞分裂的抑制作用

处理	浓度(log M)	³ H - 胸苷(CPM×1000)
地塞米松	-5	14.1
	-7	15.0
DXN	-5	10.8
	-7	12.6

结论

- 5 从上面报告的结果可以看出, 新的硝基衍生物的活性和安全性要比前体留体所具有的要好。