

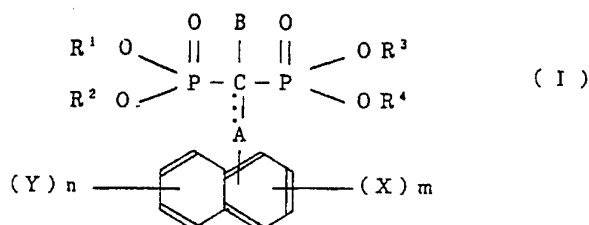


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07F 9/38, 9/40, A61K 31/66 A61K 31/675	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/01442 (43) 国際公開日 1994年1月20日 (20.01.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/00014 (22) 国際出願日 1993年1月8日 (08. 01. 93) (30) 優先権データ 特願平4/183866 1992年7月10日 (10. 07. 92) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 川辺紀雄 (KAWABE, Norio) [JP/JP] 〒251 神奈川県藤沢市渡内1丁目2番14号 Kanagawa, (JP) 内呂拓実 (UCHIRO, Hiromi) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市鎌倉山三丁目20-1 Kanagawa, (JP) 中館映夫 (NAKADATE, Teruo) [JP/JP] 〒240 神奈川県横浜市長谷区星川1-1-1113 Kanagawa, (JP) 棚橋正彦 (TANAHASHI, Masahiko) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市津西1-31-22 東レ津社宅S-303 Kanagawa, (JP) 船場由利子 (FUNABA, Yuriko) [JP/JP] 〒252 神奈川県藤沢市亀井野3263-7-A202 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 宇井正一, 外 (UI, Shoichi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), KR, NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : METHANEDIPHOSPHONATE DERIVATIVE, PRODUCTION THEREOF, AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

(54) 発明の名称 メタンジホスホン酸誘導体、その製造方法およびその医薬用途

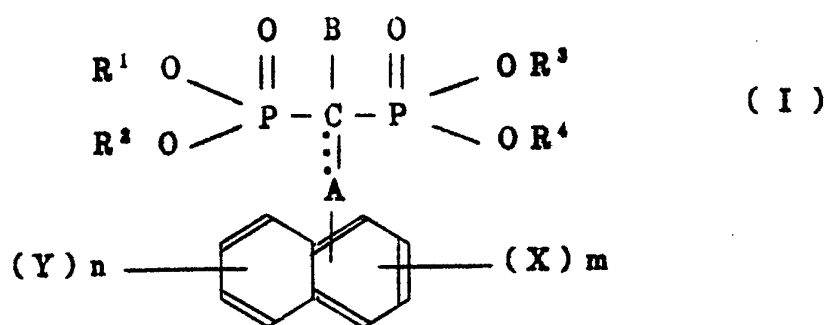


(57) Abstract

A methanediphosphonate derivative represented by general formula (I), which is excellent in the activities of IL-1 inhibition, oxidation resistance and inhibition of bone resorption, and is useful as an anti-inflammatory, antirheumatic, drug for autoimmune diseases, and so forth, wherein X and Y represent each a substituent on the naphthalene ring, such as halogen; m is an integer of 0 to 3; n is an integer of 0 to 4; symbol ... represents a double or a single bond; A represents, for example, $-(CH_2)_a-$ (D) $_{b-}(CH_2)_c-$ wherein D represents sulfur, oxygen, NH, alkyl-substituted nitrogen or CH_2 , a and c represent each an integer of 0 to 10, and b represents 0 or 1; B represents hydrogen, etc.; and R¹, R², R³ and R⁴ represent each hydrogen, etc.

(57) 要約

一般式 (I) で示されるメタンジホスホン酸誘導体。



〔式中、X、Yはナフチル基上の置換基を表わし、ハロゲン等を意味し、mは0～3の整数、nは0～4の整数を表わす。≡は二重結合または単結合を表わし、Aは $-(\text{CH}_2)_a-(\text{D})_b-(\text{CH}_2)_c-$ (Dは硫黄、酸素、NH、アルキル置換Nまたは CH_3 であり、aとcは0～10の整数であり、bは0または1である)等を、Bは水素等を意味する。R¹、R²、R³およびR⁴は、水素等を意味する。〕

本発明化合物は、優れたIL-1抑制作用、抗酸化作用、骨吸収抑制作用を持ち、抗炎症薬、抗リウマチ薬、自己免疫疾患薬などとして有用な化合物である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CN 中国

CS チェッコスロヴァキア
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリア
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国

KR 大韓民国
KZ カザフスタン
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュー・ジーランド

PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア共和国
SN セネガル
TD チャード
TG トーゴ
UA ウクライナ
US 米国
UZ ウズベキスタン共和国
VN ヴェトナム

明 細 書

メタンジホスホン酸誘導体、その製造方法およびその医薬用途

技術分野

本発明は生体内で発熱惹起反応、炎症惹起反応、各種血球の活性化、骨破壊作用などを持つインターロイキン-1の作用を抑制し、同時に細胞障害や脂肪の変性などを引き起こす活性酸素の抑制作用および骨粗鬆症や慢性関節リウマチ疾患時の骨破壊を抑制する作用を持った新規メタンジホスホン酸誘導体に関する。

背景技術

これまで主に骨代謝疾患薬として開発されてきたジホスホン酸系化合物の多くは、骨破壊抑制作用をもち、慢性関節リウマチなど関節炎発症時の骨破壊を抑制することが期待されてきた。特開昭59-42395号公報、特開平2-22285号公報、特開平3-77894号公報および特開昭60-174792号公報にはジホスホン酸構造の化合物が記載されているが、これらのジホスホン酸系化合物は骨吸収抑制作用が中心で、骨代謝疾患薬としては有効であるが慢性関節リウマチの治療としてはまだ十分ではない。

ジホスホン酸系化合物が慢性関節リウマチの治療などに用いられるには、骨吸収抑制作用と同時に炎症に関与するメディエーターであるインターロイキン-1（以下IL-1と略す）を抑制し、活性化した好中球やマクロファージによる細胞障害を抑制するなどの一層優れた作用をあわせ持った新しい薬剤が望まれている。

発熱、炎症に関与するメディエーターとしてIL-1が知られており、その抑制剤が抗炎症薬として期待されてきた。しかしながら

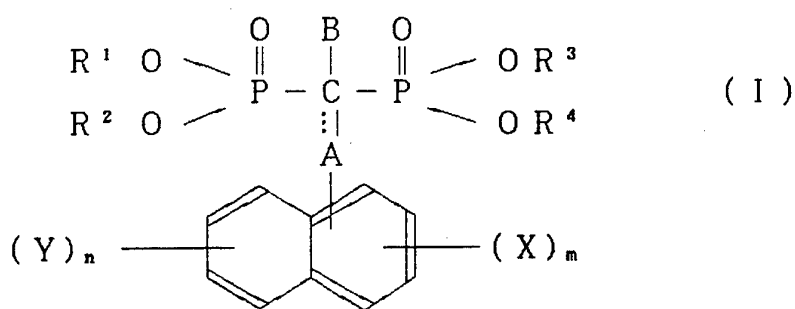
他の多くのサイトカインと同様に I L - 1 も主に局所で作用しているものと考えられ、試験管内では I L - 1 を抑制する物質は数多く報告されてきたが、実際に生体内で I L - 1 を抑制し病態を改善する十分な作用を持った抗炎症薬は、開発されるに至っていない。また炎症時などには炎症部位に活性化した好中球やマクロファージの浸潤が認められ、これらの血球が産生する活性酸素は異物消化という作用を持つが、炎症が慢性化したような場合には正常組織までも障害する事が知られている。この様に I L - 1 抑制作用と抗酸化作用を持つ化合物は抗炎症薬としてはもちろん、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患や、虚血時に起こる脳や肝臓の臓器障害などに対しても有用であると考えられる。

発明の開示

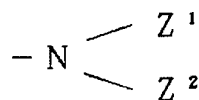
本発明者らは、ジホスホン酸誘導体に骨代謝疾患薬としての作用だけでなく、I L - 1 を抑制する作用や抗酸化作用を付与する事で、優れた抗炎症作用等を示すジホスホン酸系化合物について研究を重ねてきた。この研究の過程において、ジホスホン酸構造に対してナフタレン骨格を付与すれば、既存薬にはない I L - 1 を抑制する効果や抗酸化作用が生じることを見いだした。

本発明は、インターロイキン-1 を抑制する作用、抗酸化作用並びに骨破壊抑制作用を持つ有用な新規化合物を提供することを目的とする。

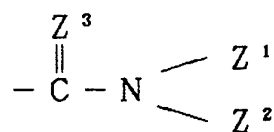
すなわち本発明は、一般式 (I) に示されるメタンジホスホン酸誘導体



[式中、X、Yはナフチル基上の置換基を表わし、ハロゲン、ニトロ基、ニトリル基、アルキル基、アルコキシ基、トリフルオロメチル基、



基（ただし、 Z^1 および Z^2 は互いに独立した、水素、アルキル基を意味し、または、 Z^1 と Z^2 で炭素からなる環またはヘテロ原子を含む炭素からなる環を形成してもよい）、



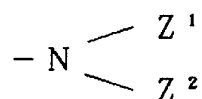
基（ただし、 Z^1 および Z^2 は上記と同じであり、 Z^3 は酸素または硫黄を意味する）、チオール基、水酸基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アシルオキシ基、アシルアミノ基、アシルチオ基、アシル基、アルケニル基、アリール基、シクロアルキル基、 COOH 基、または COO アルキル基を意味し、 m は0～3の整数、 n は0～4の整数を表わし、 m 個のXと n 個のYはそれぞれ同一または異なってもよい。 $\cdots$ は二重結合または単結合を表わし、Aは
 $-(\text{CH}_2)_a-(\text{D})_b-(\text{CH}_2)_c-$ （Dは硫黄、酸素、NH、アルキル置換Nまたは CH_2 であり、 a と c は0～10の整数であり、 b は0または1である）、または $-(\text{CH}=\text{CH})_d-\text{C}$

H = (d は 0 ~ 2 の整数であり、A が - (CH = CH) d - CH = を表す場合、B は存在しない) であり、B は水素、アルキル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アシルアミノ基、水酸基、アルコキシ基、トリアルキルシロキシ基またはアシルオキシ基を意味する、R¹、R²、R³ および R⁴ は、水素、炭素数 1 ~ 7 の直鎖または分岐鎖のアルキル基または薬理的に許容できる陽イオンであり、同一または異なってもよい。] であり、該誘導体の製造方法ならびに該誘導体を有効成分とする抗炎症薬、抗リウマチ薬、骨代謝疾患薬、インターロイキン-1 抑制薬、抗酸化薬、骨破壊抑制薬などの医薬用途に関するものである。

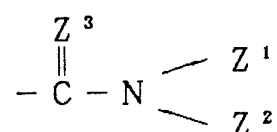
具体的な説明

無置換のナフチル基の場合は、1-ナフチル基または2-ナフチル基を表わし、1個以上の置換基を有するナフチル基の場合は、2位から8位に置換基を有する1-ナフチル基または1位または3位から8位に置換基を有する2-ナフチル基を表す。ナフチル基が置換基を有する場合、好ましい置換基の位置は、ナフチル基が1-ナフチル基の場合、Xで置換される位置は2位および/または4位であり、Yで置換される位置は5位および/または6位および/または8位であり、ナフチル基が2-ナフチル基の場合、Xで置換される位置は1位および/または4位であり、Yで置換される位置は5位および/または6位および/または8位である。置換基X、Yとして用いられるハロゲン原子はフッ素、塩素、臭素、ヨウ素である。アルキル基（以下に示すアルキル基は同じ意味を有する）は、炭素数 1 ~ 7 の直鎖または分岐鎖のもので、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、シクロヘキシルメチルなどが挙げられる。アルコキ

シ基は、炭素数 1～7 からなるもので、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシなどが挙げられる。



基 (Z^1 と Z^2 のアルキルは上記と同じ) はアミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ピロリジノ、ピペリジノ、モルホリノ、チオモルホリノなどが挙げられる。



基 (Z^1 、 Z^2 および Z^3 は上記と同じ) は、カルバモイル、チオカルバモイル、N-メチルアミノカルボニル、N, N-ジメチルアミノカルボニル、ピペリジノカルボニル、ピロリジノカルボニル、モルホリノカルボニルなどが挙げられる。アルキルチオ基 (アルキルは上記のアルキル基と同じ) は、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、シクロペンチルチオ、シクロヘキシルチオなどが挙げられる。アリールチオ基は、好ましくは炭素数 6～15 であり、フェニルチオ、置換フェニルチオなどである。アシルオキシ、アシルアミノ、アシルチオ、アシル基のアシル (基) は、炭素数 2～7 の直鎖または分岐鎖のもので、例えばアセチル、プロパノイル、ブタノイルなどが挙げられる。アルケニル基は、炭素数 2～7 の直鎖または分岐鎖のものでビニル、アリル、2-プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、ペンテニルなどが挙げられる。アリール基は好ましくは炭素数 6～15 であり、フェニル、置換フェニル、ナフチルなどである。シクロアルキル基は、炭素数 3～8 のもので、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロ

ヘキシルなどが挙げられる。COOアルキル基（アルキルは上記のアルキル基と同じ）は、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニルなどが挙げられる。

Aは $-(CH_2)_a-(D)_b-(CH_2)_c-$ であり、 $\cdots$ が単結合を示す場合、Dは硫黄、酸素、NH、アルキル置換N（ここで、アルキルとは炭素数1～7の直鎖または分岐鎖アルキル基である）または CH_2 であり、aとcは0～10の整数であり、bは0または1である（ただし、 $b=0$ の場合は $a=c=0$ である）。より好ましくはa、b、cが独立して0または1である。

またはAが $-(CH=CH)_d-CH=$ の場合には、 $\cdots$ が二重結合であり、dは0～2の整数であり、Bは存在しない。

さらに、Bが水素、アルキル基以外、且つDが CH_2 で $b=1$ 以外の場合、 $C=0$ のものは化学的に不安定なため好ましくない。しかし、この場合でも $a=b=c=0$ のものは安定であり、好ましいものである。

特に好ましい具体例としては、AがS、O、NH、 $CH=$ 、 CH_2 、 CH_2S 、 CH_2O 、 CH_2NH 、 CH_2CH_2 、 SCH_2 、 SCH_2CH_2 、 $SCH_2CH_2CH_2$ 、 OCH_2 、 $NHCH_2$ などである。またナフチル基がAを介さずに（即ち、 $a=b=c=0$ のケース）、メタンジホスホン酸の炭素に直結する化合物も含まれる。

Bがアルキル基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基およびトリアルキルシロキシ基の場合のアルキルは上記のアルキル基と同様であり、またアシルアミノ基、アシルオキシ基のアシルは上記のアシルと同様である。

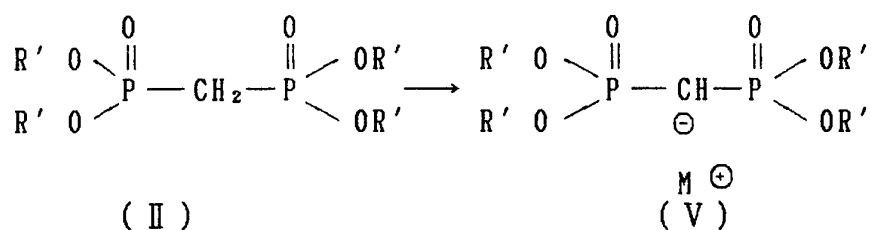
R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のアルキル基の代表的なものとしては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチ

ル、*t*-ブチル、ペンチルなどが挙げられる。

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 が水素である場合、式 (I) のホスホン酸部分は無機または有機塩基で塩を形成することができる。この場合の薬理的に許容される陽イオンとしては、金属陽イオン、アンモニウム NR_4 (ただし、 R は上記の $R^1 \sim R^4$ のアルキル基および水素と同じ) をさし、特に好ましい金属陽イオンは、アルカリ金属類、例えばリチウム、ナトリウム、カリウムなど、およびアルカリ土類金属類、例えばマグネシウム、カルシウムなどの陽イオンである。しかし、他の金属、例えばアルミニウム、亜鉛、鉄などの陽イオンも本発明に含まれる。アンモニウムとしては、アンモニア、一級アミン、二級アミン、三級アミンのアンモニウムおよび四級アンモニウムである。これらとしては、アンモニア、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、プロピルアミン、ジプロピルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、ブチルアミン、ジブチルアミン、イソブチルアミン、*t*-ブチルアミン、モノエタノールアミン、ジエタノール、トリエタノールアミンなどのアンモニウムおよびテトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウムなどが挙げられる。なかでもナトリウム、カリウム、アンモニア、アルキルアミンの陽イオンが好ましい。また $R^1 \sim R^4$ において陽イオンは同一でも異なってもよく、また陽イオンと水素が混合したもの、例えば一陽イオン塩、二陽イオン塩、三陽イオン塩も本発明に含まれる。好ましくは、一般式 (I) で示されるメタンジホスホン酸誘導体は、 $R^1 \sim R^4$ のすべてが水素からなるもの、 $R^1 \sim R^4$ のうち3つが水素で残りの1つがナトリウムであるもの、または3つが水素で残りの1つがアンモニウムであるもの、または $R^1 \sim R^4$ のうち2つが水素で、残り2つがナトリウムであるもの、または2

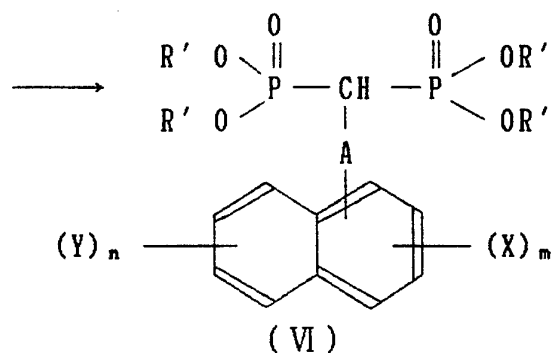
つが水素で、残りの2つがアンモニウムのものである。

本発明のメタンジホスホン酸誘導体は、当該分野における公知の方法に類似する方法によって製造することができる。例えば、本発明の式(I)のメタンジホスホン酸誘導体の1つ(BがHである場合)は、次の反応式で示される方法によって製造できる。

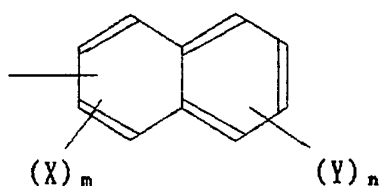


R' : 低級アルキル

M : Na または Li



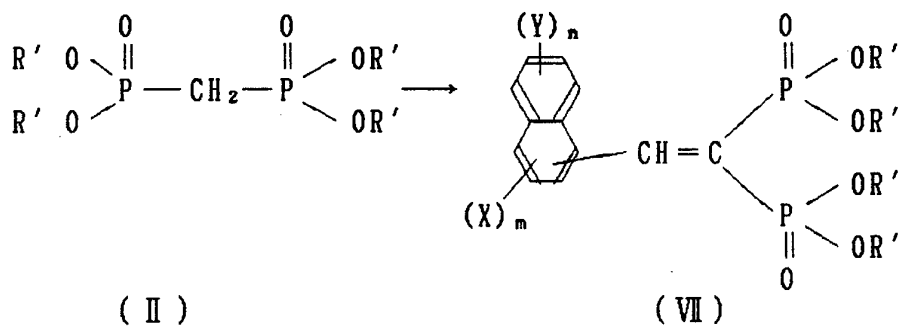
使用される出発物質は、メタンジホスホン酸の低級アルキルエステル) (II) (ただし、低級アルキルとは炭素数1~7の直鎖または分岐鎖のアルキルである) であり、水素化ナトリウム、アルキルリチウムなどの塩基と反応させることによって相応するメタル化メタンジホスホン酸エステル(V)となし、これに種々のナフチル-A基の導入剤(ここでナフチルは



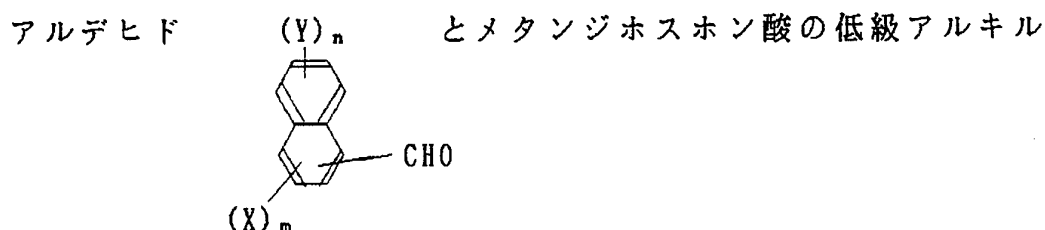
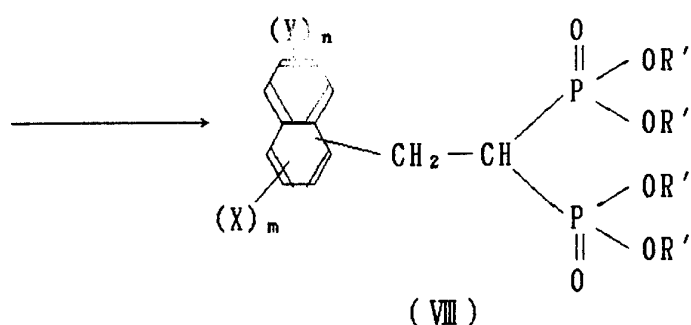
(X、Y、m、nは上記同じであり、) Aは上記定義に同じ)を反応させて、化合物(VI)とする。ナフチル-A基の導入剤として、ナフチル-(CH₂)_a-(D)_b-(CH₂)_c-ハロゲン、ナフチル-(CH₂)_a-S-ハロゲンなどのハロゲン化物、または[ナフチル-(CH₂)_a-S]₂のジスルフィド(D、a、b、cは上記のものと同様)が用いられる。

反応温度および反応時間は使用される試薬によって変わる。例えば、反応温度は-78℃と溶媒または溶媒混合物の沸点との間であり、反応時間は10分から数日まで及ぶ。

一般式(I)のメタンジホスホン酸の誘導体の別の合成法としては、例えば次の反応式で示されるものが挙げられる。



R' : 低級アルキル



エステル (II) を四塩化チタンおよび N-メチルモルホリンのような第三級アミンの存在下、縮合反応させて化合物 (VII) を得る。さらに形成された二重結合を還元して化合物 (VIII) とする。

$R^1 \sim R^4$ がアルキル基であるメタンジホスホン酸 (ホスホン酸エステル) から $R^1 \sim R^4$ が水素であるメタンジホスホン酸誘導体は、加水分解などによって得られる。例えば、ホスホン酸エステルは塩酸などの酸と反応させるか、トリメチルシリルブロミド、次いで水またはアルコールで処理することによって加水分解される。かくして得られたメタンジホスホン酸は、その塩の 1 種に公知の方法で転化されることができる。

また、メタンジホスホン酸エステルの部分加水分解、あるいはメタンジホスホン酸の部分エステル化によって $R^1 \sim R^4$ のうち 1 ~ 3 個のものがアルキル基になっている化合物 (メタンジホスホン酸の部分エステル) も本発明に含まれる。

また、本発明のメタンジホスホン酸誘導体の大部分は $P=O$ 結合がケト型として存在するが、化合物自身の化学的性質、溶媒や温度

といった外部環境によって一部エノール型として存在する場合があるが、これらも本発明の化合物の中に含まれる。

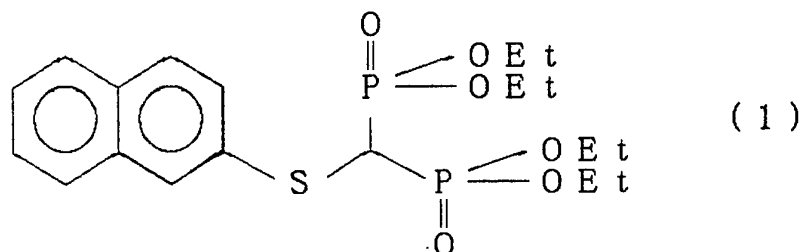
また、すべての反応において、目的とする反応以外の反応性置換基、反応性官能基を含有する場合、これらの置換基、官能基は容易に除去することができる試薬によってあらかじめブロックしておくなければならない。

本発明の化合物の対象とする疾患は、炎症性疾患、疼痛性疾患、皮膚疾患、呼吸器疾患、肝疾患、感染症、自己免疫疾患、虚血性臓器障害ないし骨代謝疾患である。例えば、（慢性）関節リウマチ、リウマチ様多発関節炎、変形性関節症、肩甲関節周囲炎、頸肩腕症候群、椎間板障害、腰痛症、腱・腱鞘炎、骨関節炎、五十肩、結合組織炎、筋肉痛、神経痛、痛風、手術後・外傷後の炎症・腫脹など（抗炎症薬、抗リウマチ薬、抗関節炎薬、鎮痛薬および解熱薬）または乾癬、喘息、肺サイルコイドーシス、ウイルス性肝炎、ヒト免疫不全ウイルス感染症、原虫類感染症、虚血性心疾患、虚血性脳障害、虚血性肝障害、動脈硬化症および骨粗鬆症、ページェット病、ベヒチレフ病、高カルシウム血症、異所性骨化など（代謝性骨疾患薬）の治療・予防活性の優れた薬剤の提供にある。

本発明の新規メチレンおよびメタンジホスホン酸誘導体を、先に述べた本発明の用途に用いる場合、そのままもしくは自体公知の薬学的に許容されうる担体、賦形剤などと混合した医薬組成物として使用に供される。投与は、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、丸剤などの経口投与、注射剤、シロップ剤、軟膏剤、坐剤などの非経口投与のいずれであっても良い。投与量は、投与対象、投与ルート、症状などによって異なるが、約0.1mg～5g程度、好ましくは1mg～2g程度であり、これを1日1～数回に分けて、または1回／1日～7日の割合で、経口または非経口投与する。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1. 2-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル(1)

アルゴン雰囲気下、メタンジホスホン酸テトラエチル 10.09 g (35 mmol) の乾燥テトラヒドロフラン (100 ml) 溶液を -78°C に冷却し、これに *n*-ブチルリチウムヘキサン溶液 [1.59 mmol / 1] 22.01 ml (35 mmol) を加え、30 分間攪拌した。次に、この混合物に 2, 2'-ジナフチルジスルフィド 11.15 g (35 mmol) の乾燥テトラヒドロフラン (75 ml) 溶液を加えた後、室温まで昇温し、16 時間攪拌した。得られた混合物を氷水中に投入し、6 規定の塩酸で中和した後、酢酸エチル ($3 \times 150\text{ ml}$) で抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 エタノール : 酢酸エチル = 5 : 95) で精製し、表題化合物 8.82 g を無色油状物として得た。収率 57%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) [ppm] : 1.33(t, $J=7\text{Hz}$, 12H), 3.55(t, $J=21\text{Hz}$, 1H), 4.00 ~ 4.55(m, 8H), 7.46 ~ 7.52(m, 3H), 7.76 ~ 7.83(m, 3H), 8.07(s, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 2984, 1626, 1589, 1502, 1392, 1257, 1029, 975

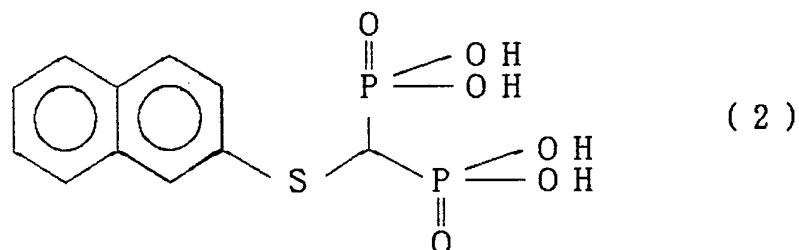
MASS (FAB) m/z : 447 ($\text{M} + \text{H}$) $^{+}$

EA ($C_{19}H_{28}O_6 P_2 S$ として)

計算値 (%) : C 51.12 H 6.33

測定値 (%) : C 51.10 H 6.29

実施例 2. 2-ナフチルチオメタンジホスホン酸 (2)



アルゴン雰囲気下、実施例 1 で得られた 2-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル 8.04 g (18 mmol) の乾燥塩化メチレン (100 ml) 溶液に、室温で臭化トリメチルシラン 27.56 g (180 mmol) を滴下し、そのまま室温で 72 時間攪拌した。減圧下溶媒および過剰の臭化トリメチルシランを留去した後、得られた残渣を水：メタノール = 5 : 95 の混合液に溶解し、30 分間加熱・還流して再び減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をアセトン-塩化メチレンを溶媒として結晶化させ、得られた結晶を再度同じ溶媒系から再結晶して表題化合物を白色結晶として得た。収率 86%。

m. p. : 218.5 ~ 219.5 °C (dec)

^1H-NMR (CD_3OD) [δ ppm] : 3.51 (t, $J=21Hz$, 1H), 7.42 ~ 7.51 (m, 2H), 7.65 ~ 7.70 (m, 1H), 7.74 ~ 7.87 (m, 3H), 8.10 ~ 8.12 (m, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 2926, 1657, 1638, 1620, 1151, 973, 812

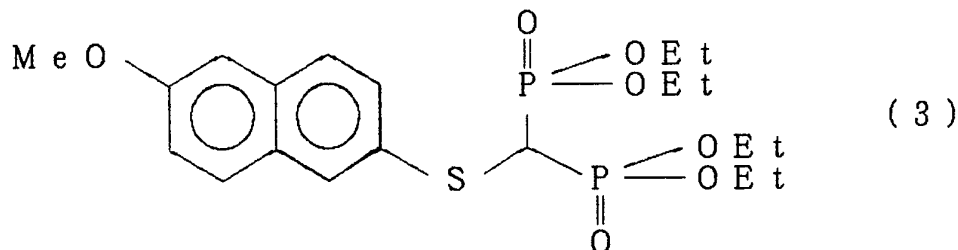
MASS (FAB) m/z : 335 ($M+H$)⁺

EA ($C_{11}H_{12}O_6 P_2 S$)として

計算値 (%) : C 39.53 H 3.63

測定値 (%) : C 39.62 H 3.70

実施例 3. 6-メトキシ-2-ナフチルチオメタンジホスホン酸
テトラエチル (3)



(a) 6, 6'-ジメトキシ-2, 2'-ジナフチルジスルフィド

アルゴン雰囲気下、6, 6'-ジヒドロキシ-2, 2'-ジナフチルジスルフィド 10.00 g (28.5 mmol) の乾燥ジメチルホルムアミド (250 ml) 溶液を -23℃ に冷却し、これに水素化ナトリウム (60% ミネラルオイルディスパージョン) 3.42 g (85.5 mmol) を徐々に加え、水素の発生が止むまで攪拌した。次に、この混合物にヨウ化メチル 12.14 g (85.5 mmol) を加えた後、室温まで昇温し、2 時間攪拌した。得られた混合物を氷水中に投入し、酢酸エチル (3 × 150 ml) で抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下溶媒を留去した。得られた結晶を酢酸エチル-石油エーテルから再結晶して、6, 6'-ジメトキシ-2, 2'-ジナフチルスルフィド 9.92 g を橙色結晶として得た。収率 92%。

m. p. : 125 ~ 126℃

¹H-NMR (CDCl₃) [ppm] : 3.89(s, 6H), 7.00 ~ 7.25(m, 4H), 7.45 ~ 7.75(m, 6H), 7.85 ~ 7.95(m, 2H)

(b) 6-メトキシ-2-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル

実施例1と同様の方法により、メタンジホスホン酸テトラエチル 10.09 g (35 mmol) と 6, 6'-ジメトキシ-2, 2'-ジナフチルジスルフィド 13.25 g (35 mmol) から、表題化合物 11.34 g を淡黄色油状物として得た。収率 68%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) [ppm] : 1.33(t, $J=7\text{Hz}$, 6H), 1.35(t, $J=7\text{Hz}$, 6H), 3.48(t, $J=22\text{Hz}$, 1H), 3.91(s, 3H), 4.00~4.45(m, 8H), 7.00~7.30(m, 2H), 7.50~7.80(m, 3H), 8.00~8.10(m, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 2984, 2936, 2910, 1628, 1593, 1390, 1259, 1214, 1023, 975

MASS (FAB) m/z : 477 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

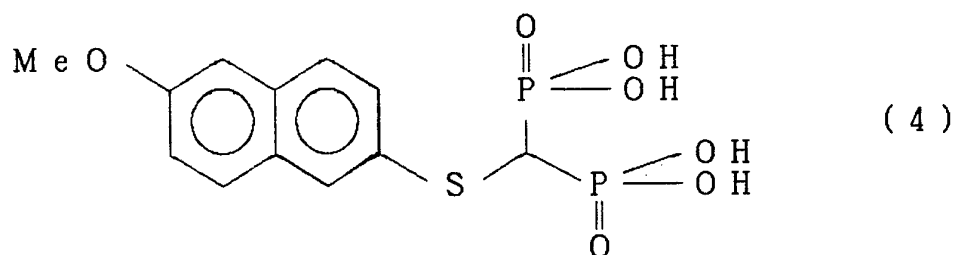
EA ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_7\text{P}_2\text{S}$ として)

計算値(%) : C 50.42 H 6.36

測定値(%) : C 50.65 H 6.42

実施例4. 6-メトキシ-2-ナフチルチオメタンジホスホン酸

(4)



実施例2と同様の方法により、実施例3で得られた6-メトキシ-2-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル 7.15 g (15 mmol) を乾燥塩化メチレン中、臭化トリメチルシランで処理し、その後加水分解することにより、表題化合物 4.21 g を白色結晶として得た。収率 77%。

m. p. : 234 ~ 235 °C (dec)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) [ppm] : 3.37 (t, $J=21\text{Hz}$, 1H),
3.90 (s, 3H), 7.12 ~ 7.23 (m, 2H), 7.65 ~ 7.75 (m, 3H), 8.05 ~ 8.09
(m, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 2920, 1628, 1466, 1214, 1125, 994, 924,
911

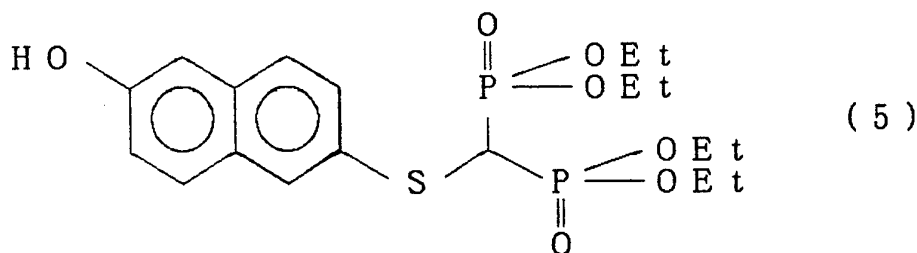
MASS (FAB) m/z : 365 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

EA ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{P}_2\text{S}$ として)

計算値 (%) : C 39.57 H 3.88

測定値 (%) : C 39.55 H 3.79

実施例 5. 6-ヒドロキシ-2-ナフチルチオメタンジホスホン酸
テトラエチル (5)



(a) 6, 6'-ジ(1-ブチルジメチルシロキシ)-2, 2'-ジナフチルジスルフィド

アルゴン雰囲気下、6, 6'-ジヒドロキシ-2, 2'-ジナフチルジスルフィド 10.00 g (28.5 mmol) およびイミダゾール 9.70 g (140 mmol) のジメチルホルムアミド

(150 ml) 溶液を 0 °C に冷却し、これに 1-ブチルジメチルクロロシラン 12.89 g (85.5 mmol) の乾燥ジメチルホルムアミド (50 ml) 溶液を加え、室温まで昇温した後、3 時間攪拌した。得られた混合物を氷水中に投入し、酢酸エチル (3 × 150 ml) で抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下溶媒を留去した。得られた残

渣をカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 酢酸エチル：n-ヘキサン＝5：95）で精製し、表題のジスルフィド化合物を淡黄色油状物として得た。収率99%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) [ppm] : 0.23(s, 6H), 1.00(s, 9H), 6.95~7.20(m, 2H), 7.45~7.70(m, 3H), 7.85~7.95(m, 1H)

(b) 6-ヒドロキシ-2-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル

実施例1と同様の方法により、メタンジホスホン酸テトラエチル10.09g (35mmol)と6,6'-ジ(t-ブチルジメチルシロキシ)-2,2'-ジナフチルジスルフィド13.25g (35mmol)との反応を行い、得られた残渣を単離することなく6規定塩酸：メタノール＝1：20の混合液に溶解し、50℃で3時間加熱・攪拌して再び減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 エタノール：酢酸エチル＝5：95）で精製し、表題化合物10.02gを淡黄色の徐々に結晶化する油状物として得た。

収率62%。

m. p. : 85.5~86.5℃

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) [ppm] : 1.35(t, J=7Hz, 12H), 3.50(t, J=22Hz, 1H), 4.05~4.65(m, 8H), 6.95~7.20(m, 2H), 7.25~7.70(m, 3H), 7.90~8.05(m, 1H), 8.95(brs, 1H)

I R (KBr) [cm^{-1}] : 3148, 2984, 1626, 1392, 1232, 1212, 1027

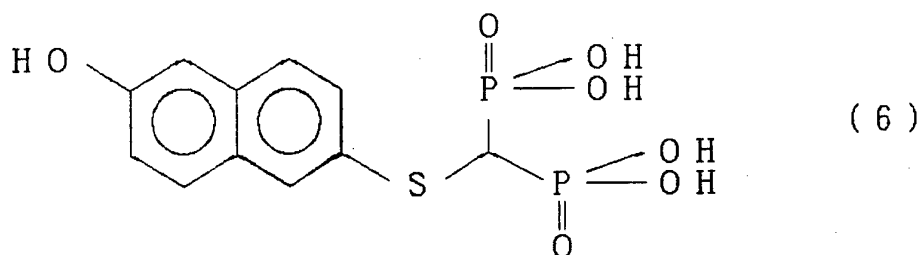
MASS (FAB) m/z : 463 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

EA ($\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_7\text{P}_2\text{S}$ として)

計算値(%) : C 49.35 H 6.12

測定値(%) : C 49.39 H 6.11

実施例 6. 6-ヒドロキシ-2-ナフチルチオメタンジホスホン酸
(6)



実施例 2 と同様の方法により、実施例 5 で得られた 6-ヒドロキシ-2-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル 7. 15 g (15 mmol) を臭化トリメチルシランで処理し、その後、加水分解することにより、表題化合物 4. 21 g を白色結晶として得た。収率 75%。

m. p. : 210 ~ 211 °C

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) [ppm] : 3.51 (t, $J=20\text{Hz}$, 1H), 7.02 ~ 7.13 (m, 2H), 7.48 ~ 7.55 (m, 1H), 7.55 ~ 7.62 (m, 1H), 7.63 ~ 7.69 (m, 1H), 7.90 ~ 7.97 (m, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 3570, 3164, 1636, 1506, 1135, 1046, 939, 919

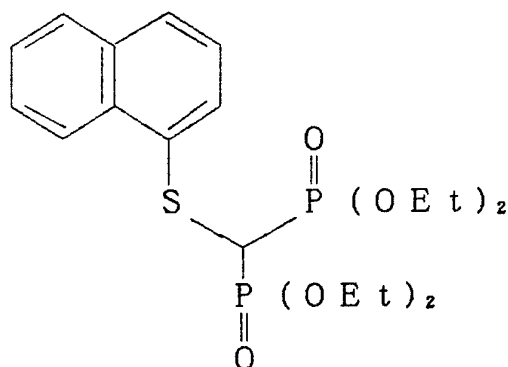
MASS (FAB) m/z : 351 ($\text{M} + \text{H}^+$)

EA ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_7\text{P}_2\text{S}$ として)

計算値 (%) : C 37.73 H 3.46

測定値 (%) : C 37.80 H 3.55

実施例 7. 1-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル (7)



(a) 1, 1'-ジナフチルジスルフィド

アルゴン雰囲気下、1-ナフタレンスルホニルクロリド 22.67 g (100.0 mmol) の乾燥塩化メチレン (250 ml) 溶液にヨードトリメチルシラン 100.0 g (500.0 mmol) をゆっくり加え、6 時間攪拌した。得られた混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に投入し、塩化メチレン (3 × 150 ml) で抽出した。有機層をヨウ素の着色が消えるまで飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、さらに水および飽和食塩水で洗浄したのち、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた結晶を酢酸エチル-n-ヘキサンから再結晶して、表題化合物 12.43 g を淡黄色結晶として得た。

収率 78%。

m. p. : 85 ~ 86 °C

¹H-NMR (CDCl₃) [ppm] : 7.15~8.00(m, 12H),
8.20~8.45(m, 2H)

(b) 1-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル

実施例 1 と同様の方法により、メタンジホスホン酸テトラエチル 10.9 g (35 mmol) と 1, 1'-ジナフチルジスルフィド 11.15 g (35 mmol) から表題化合物 9.38 g を淡黄

色油状物として得た。

収率 60 %。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) [ppm] : 1.30 (t, $J=7\text{Hz}$, 12H),
3.55 (t, $J=21\text{Hz}$, 1H), 3.95~4.45 (m, 8H), 7.30~7.75 (m, 3H), 7.75 ~
8.10 (m, 3H), 8.55 ~8.75 (m, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 3434, 2984, 2934, 2910, 1506, 1444,
1255, 1164, 1098, 1013, 971

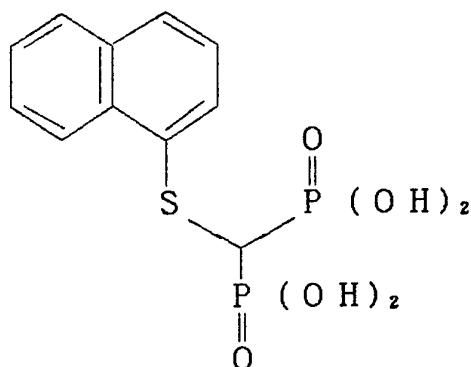
MASS (FAB) m/z : 447 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

EA ($\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_6$ P_2S として)

計算値 (%) : C 51.12 H 6.33

測定値 (%) : C 51.33 H 6.19

実施例 8. 1-ナフチルチオメタンジホスホン酸 (8)



実施例 2 と同様の方法により、1-ナフチルチオメタンジホスホン酸テトラエチル 6.70 g (15 mmol) を臭化トリメチルシランで処理し、その後、加水分解することにより、表題化合物 3.92 g を白色結晶として得た。

収率 78%。

m. p. : 241 ~ 242 °C (dec)

¹H-NMR (CD₃OD) [ppm] : 3.45 (t, J=21Hz, 1H),
7.30 ~ 7.70 (m, 3H), 7.75 ~ 8.10 (m, 3H), 8.60 ~ 8.80 (m, 1H)

IR (KBr) [cm⁻¹] : 2910, 2892, 1506, 1185, 1141, 1006, 932

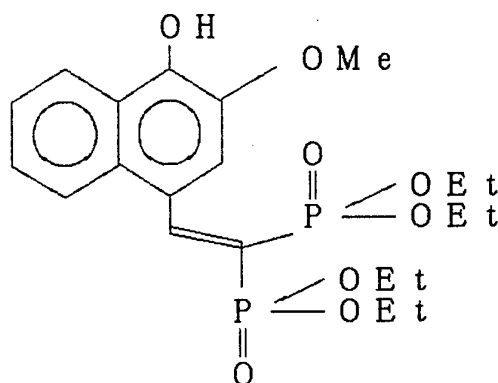
MASS (FAB) m/z : 335 (M+H)⁺

EA (C₁₁H₁₂O₆P₂S として)

計算値 (%) : C 39.53 H 3.63

測定値 (%) : C 39.44 H 3.70

実施例 9. 2-[3-メトキシ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル]
エテニリデン-1, 1-ジホスホン酸テトラエチル



アルゴン雰囲気下、乾燥テトラヒドロフラン 55 ml を 0℃ に冷却し、これに四塩化チタン 20.49 g (108 mmol) の乾燥塩化メチレン (15 ml) 溶液を 15 分かけて徐々に滴下した。得られた混合物にメタンジホスホン酸テトラエチル 15.57 g (54 mmol) の乾燥テトラヒドロフラン (40 ml) 溶液および 3-メトキシ-4-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒド 10.92 g (54 mmol) の乾燥テトラヒドロフラン (40 ml) 溶液を加え 10 分間攪拌したのち、N-メチルモルホリン 21.85 g (216 mmol) の乾燥テトラヒドロフラン (40 ml) 溶液を内温が 5℃ を超えないように 30 分かけて徐々に滴下した。得られた混合物を 30 分攪拌したのち室温まで昇温し 5 時間攪拌した。つぎにこの混合物を氷水中に投入し、酢酸エチル (3 × 150 ml) で抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水および飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥したのち減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 エタノール：酢酸エチル = 5 : 95) で精製したのち、酢酸エチル-ジエチルエーテルを溶媒として再結晶し、表題化合物 18.37 g を黄色結晶として得た。収率 72%。

m. p. 115.5 ~ 116.5 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3Cl) [ppm] : 1.02(t, $J=7\text{Hz}$, 6H),
1.42(t, $J=7\text{Hz}$, 6H), 3.30 ~ 4.50(m, 8H), 4.04(s, 3H), 6.90(brs, 1H),
7.30 ~ 7.65(m, 2H), 7.70 ~ 7.95(m, 1H), 8.10 ~ 8.35(m, 1H), 8.20
(s, 1H), 8.35(dd, $J=24, 46\text{Hz}$, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 3190, 2990, 1553, 1363, 1247, 1226,
1036, 996

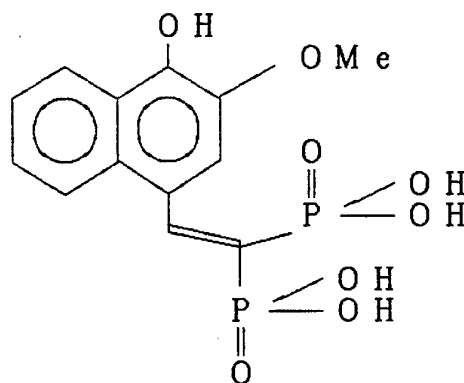
MASS (FAB) m/z : 473 ($M+H$)⁺

EA ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_8$ P_2 として)

計算値(%) : C 53.39 H 6.41

測定値(%) : C 53.33 H 6.50

実施例 10. 2-[3-メトキシ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル]
エテニリデン-1, 1-ジホスホン酸



実施例 2 と同様の方法により、実施例 9 で得られた 2-[3-メ
トキシ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル]エテニリデン-1, 1-
ジホスホン酸テトラエチル 9.45 g (20 mmol) を臭化トリ
メチルシランで処理し、その後加水分解することにより、表題化合
物 4.97 g を黄色結晶として得た。収率 69%。

m. p. 123 ~ 124 °C (dec)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) [ppm] : 4.01(s, 3H), 7.37 ~

7.52(m, 2H), 7.85 ~ 7.93(m, 1H), 8.12(s, 1H), 8.15 ~ 8.23(m, 1H), 8.73
(dd, J=28.46Hz, 1H)

I R (K B r) [c m⁻¹] : 3450, 1603, 1574, 1363, 1125, 1058,
1009

M A S S (F A B) m/z : 361 (M + H)⁺

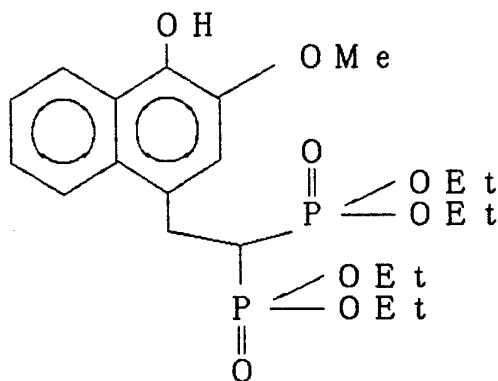
E A (C₁₃H₁₄O₈ P₂ として)

計算値 (%) : C 43.35 H 3.93

測定値 (%) : C 43.20 H 3.82

実施例 11. 2-[3-メトキシ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル]

エタノン-1, 1-ジホスホン酸テトラエチル



アルゴン雰囲気下、実施例 9 で得られた 2-[3-メトキシ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル] エタニリデン-1, 1-ジホスホン酸テトラエチル 8.50 g (18 mmol) の乾燥テトラヒドロフラン (120 ml) 溶液に、水素化ホウ素ナトリウム 2.72 g (72 mmol) を徐々に加えた。得られた混合物を 50℃ に昇温し、30 分間攪拌した。つぎに混合物を 0℃ に冷却し、飽和塩化アンモニウム水溶液を水素の発生が止むまで加えて反応を停止し、1 規定塩酸で中和したのち、酢酸エチル (3 × 150 ml) で抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水および飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥したのち減圧下溶媒を

留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 エタノール：酢酸エチル＝5：95）で精製し、表題化合物 8.28 g を淡黄色油状物として得た。収率 98%。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3Cl) [ppm] : 1.22(t, $J=7\text{Hz}$, 6H), 1.24(t, $J=7\text{Hz}$, 6H), 2.87(tt, $J=6.23\text{Hz}$, 1H), 3.70~4.50(m, 8H), 3.71 (dt, $J=6.16\text{Hz}$, 2H), 3.95 (s, 3H), 6.60(s, 1H), 7.30~7.57(m, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.95 ~8.05(m, 1H), 8.05 ~8.15(m, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 3248, 2986, 1630, 1603, 1586, 1479, 1367, 1247, 1025, 975

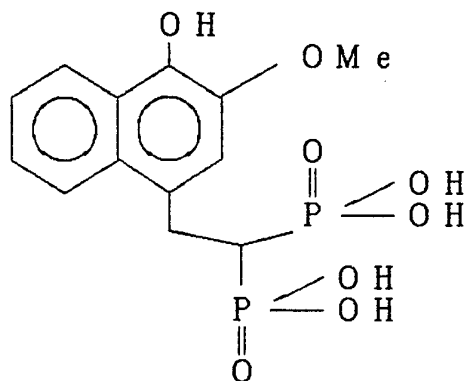
MASS (FAB) m/z : 475 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

EA ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_8$ P_2 として)

計算値 (%) : C 53.17 H 6.81

測定値 (%) : C 53.23 H 6.96

実施例 12. 2-[3-メトキシ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル]
エタノール, 1-ジホスホン酸



実施例 2 と同様の方法により、実施例 11 で得られた 2-[3-メトキシ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル] エタノール, 1-ジホスホン酸テトラエチル 7.12 g (15 mmol) を臭化トリメチルシランで処理し、その後加水分解することにより、表題化合物 3.64 g を淡黄色結晶として得た。収率 67%。

m. p. 231 ~ 232 °C (dec)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) [ppm] : 2.68 (tt, $J=6.23\text{Hz}$, 1H),
3.65 (dt, $J=6.16\text{Hz}$, 2H), 3.96 (s, 3H), 7.33 ~ 7.40 (m, 2H), 7.42 (s, 1H),
8.04 ~ 8.11 (m, 1H), 8.11 ~ 8.18 (m, 1H)

IR (KBr) [cm^{-1}] : 3324, 2906, 1638, 1475, 1402, 1278,
1176, 1033

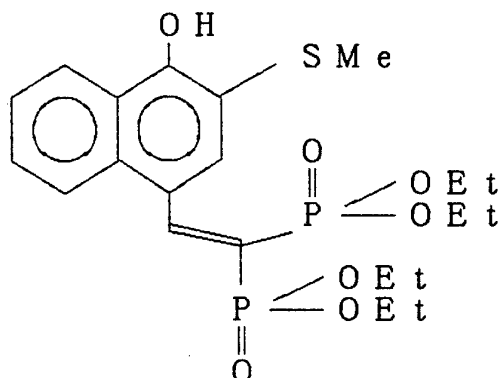
MASS (FAB) m/z : 363 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

EA ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_8$ P_2 として)

計算値 (%) : C 43.11 H 4.46

測定値 (%) : C 43.02 H 4.45

実施例 13. 2-[3-メチルチオ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル] エテニリデン-1, 1-ジホスホン酸テトラエチル



実施例 9 と同様の方法により、メタンジホスホン酸テトラエチル
14.42 g (50 mmol) および 3-メチルチオ-4-ヒドロ
キシ-1-ナフトアルデヒド 10.91 g (50 mmol) から表
題化合物 18.32 g を黄色結晶として得た。収率 75%。

m. p. 106 ~ 107 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3Cl) [ppm] : 1.03 (t, $J=7\text{Hz}$, 6H),
1.45 (t, $J=7\text{Hz}$, 6H), 2.43 (s, 3H), 3.70 ~ 4.50 (m, 8H), 7.50 (s, 1H), 7.50
~ 7.70 (m, 2H), 7.70 ~ 7.90 (m, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.20 ~ 8.45 (m, 1H),

8.80 (dd, $J=28.46\text{Hz}$, 1H)

I R (K B r) [cm^{-1}] : 2990, 1568, 1396, 1313, 1251, 1212, 1046, 982

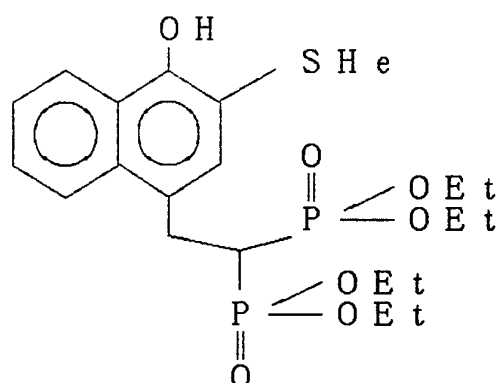
M A S S (F A B) m/z : 489 ($M+H$)⁺

E A ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_7$ P_2S として)

計算値 (%) : C 51.64 H 6.20

測定値 (%) : C 51.55 H 6.33

実施例 14. 2-[3-メチルチオ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル]
エタン-1, 1-ジホスホン酸テトラエチル



実施例 11 と同様の方法により、2-[3-メチルチオ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル] エテニリデン-1, 1-ジホスホン酸テトラエチル 8.79 g (18 mmol) を水素化ホウ素ナトリウム 2.72 g (72 mmol) を用いて還元することにより、表題化合物 8.73 g を淡黄色油状物として得た。収率 99%。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3Cl) [ppm] : 1.22 (t, $J=7\text{Hz}$, 6H), 1.26 (t, $J=7\text{Hz}$, 6H), 2.37 (s, 3H), 2.82 (tt, $J=6.23\text{Hz}$, 1H), 3.65 (dt, $J=6.16\text{Hz}$, 2H), 3.80 ~ 4.35 (m, 8H), 7.23 (s, 1H), 7.35 ~ 7.70 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.93 ~ 8.18 (m, 1H), 8.18 ~ 8.42 (m, 1H)

I R (K B r) [cm^{-1}] : 3216, 2986, 2928, 1572, 1450, 1388, 1249, 1019, 975

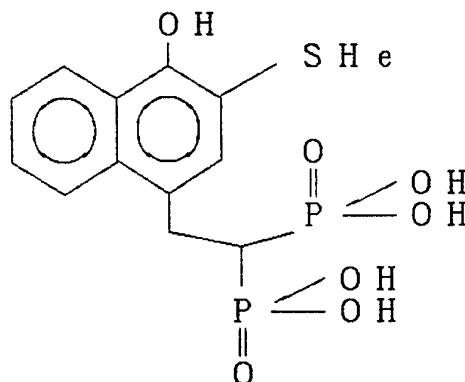
MASS (FAB) m/z : 491 (M+H)⁺

EA (C₂₁H₃₂O₇ P₂ Sとして)

計算値 (%) : C 51.42 H 6.60

測定値 (%) : C 51.66 H 6.73

実施例 15. 2-[3-メチルチオ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル]
エタン-1, 1-ジホスホン酸



実施例 2 と同様の方法により、2-[3-メチルチオ-4-ヒドロキシ-1-ナフチル]エタン-1, 1-ジホスホン酸テトラエチル 7.36 g (15 mmol) を臭化トリメチルシランで処理し、その後加水分解することにより、表題化合物 4.03 g を淡黄色結晶として得た。収率 71%。

m. p. 195~196°C (dec)

¹H-NMR (CD₃OD) [ppm] : 2.39(s, 3H), 2.68(tt, J=6.23Hz, 1H), 3.63(dt, J=6.16Hz, 2H), 7.35~7.70(m, 2H), 7.57(s, 1H), 8.00~8.40(m, 2H)

IR (KBr) [cm⁻¹] : 3386, 1578, 1392, 1276, 1210, 1162, 1079, 1013

MASS (FAB) m/z : 379 (M+H)⁺

EA (C₁₃H₁₆O₇ P₂ Sとして)

計算値 (%) : C 41.28 H 4.27

測定値 (%) : C 41.33 H 4.38

実施例 16. アジュバント関節炎試験

結核菌アジュバントをラットに注射すると、ヒト慢性関節リウマチに似た多発性関節炎が生ずる。このアジュバント関節炎モデルを用いて、以下の手順で、本発明の化合物の抗炎症・抗リウマチおよび骨代謝改善の作用を調べた。

結核菌 (*Mycobacterium butyricum*) 乾燥死菌体 0.1 mg を流動パラフィン 0.1 ml に懸濁させ、Lewis 系雌性ラット 7 週齢の左後肢足蹠皮内に注射した。実施例で得られた化合物は、滅菌蒸留水に溶解して、体重 1 kg あたり 20 mg の割合で、アジュバント注射日から 8 日目より 21 日目まで 2 週間連日皮下投与した。この間、左右後肢の足容積の測定を行ない、下記式により浮腫率を算定した。

$$\text{浮腫率} = \frac{[16, 17 \text{ または } 21 \text{ 日目の足容積 (ml)} - 7 \text{ 日目の足容積 (ml)}]}{[7 \text{ 日目の足容積 (ml)}]} \times 100$$

さらに下記式にて浮腫抑制率を求め、表 1 に示す。

$$\text{浮腫抑制率} = \frac{[\text{対照群の平均浮腫率} - \text{化合物投与群の平均浮腫率}]}{[\text{対照群の平均浮腫率}]} \times 100$$

22 日目にラットを屠殺し、左右後肢の軟 X 線写真を撮影した。軟 X 線写真をもとに、左右後肢 5ヶ所における骨破壊の程度を、それぞれ 5 段階の点数をつけて評価し、総数を骨破壊点数とした。さらに骨破壊抑制率を下記式にて算出し、表 1 に示す。

骨破壊抑制率

$$= \frac{[\text{対照群の平均骨破壊点数} - \text{化合物投与群の平均骨破壊点数}]}{[\text{対照群の平均骨破壊点数}]}$$

$$\times 100$$

得られた結果は、スチューデントのt検定およびチューキの多重比較法により、滅菌蒸留水のみを投与した対照群に対して、危険率 $P < 0.001$ で有意のものは*** 印を、 $P < 0.01$ で有意のものには** 印を、 $P < 0.05$ で有意のものには* 印を付した。

表1より明らかとなっており、本発明による化合物により、アジュバント関節炎の1次および2次炎症による足浮腫と骨破壊は抑制された。

表 1

化 合 物	例 数	対照群に対する浮腫抑制率 (%)				対照群に対 する骨破壊 抑制率(%)
		16または17日目		21日目		
		左	右	左	右	22日目
実施例2 の化合物	6	76.8***	35.2**	94.5***	44.3***	75.2**
実施例4 の化合物	6	80.0***	40.8**	93.0***	33.4***	55.2**
実施例6 の化合物	6	85.6***	31.8*	117.3***	39.9**	60.3**

実施例2および4の化合物においては17日目および21日目に、また実施例6の化合物においては16日目と21日目の足浮腫測定を行なった。

実施例17. マウスマクロファージ株細胞J774-1よりのIL-1産生に対する作用

リンパ球であるマクロファージは、異物排除機構として、侵入してきた微生物や血球の破片などを貪食し、B細胞に抗原提示すると

共に、活性酸素を放出して異物を消化する。この際にマクロファージは、種々のサイトカインを放出するが、なかでもIL-1は発熱や、炎症、軟骨・骨破壊、白血球の活性化、血管内皮細胞の障害などの作用を持ち、さらに他のサイトカインを誘導することで種々の作用を示すことが知られている。

マウスマクロファージ株細胞J774-1はIL-1の高い産生を示すものから選択された株細胞であり、LPSで刺激を行うとIL-1産生を示すことが知られている。この細胞株を用いて、以下の手順で本発明の化合物のIL-1産生抑制作用を測定した。

J774-1細胞を、10%牛胎児血清および2-メルカプトエタノール 50 μ Mを含むRPMI-1640培地にて培養し、 2×10^5 個/mlの細胞数に調製した。24ウエルプレートにこの細胞浮遊液を1mlずつ入れ30分間培養した。その後にLPSを最終濃度1 μ g/mlとなるように添加し、同時に実施例で得られた化合物を、滅菌蒸留水に溶解して100 μ Mの濃度で添加した。37℃、5%CO₂環境下で24時間培養した後上清を採取し、遠心して細胞の破片等を除いた後、0.22 μ mのフィルターを通して滅菌した。

IL-1の活性測定は、C3H/He J雄性マウスの胸腺細胞増殖活性で測定した。即ち、C3H/He J雄性マウスの4～6週齢を用い、胸腺を採取した。胸腺を10%牛胎児血清および2-メルカプトエタノール 50 μ Mを含むRPMI-1640培地中でほぐし、 2×10^7 個/mlの濃度に細胞液を調製した。この細胞浮遊液にフィトヘマグルチニンを最終濃度1%になるように添加しておきこれをT細胞浮遊液とした。

上記で得られたサンプルを50 μ lの容量で96ウエルマルチプレート中で2倍系列希釈を行っておき、ここにT細胞浮遊液を50

μ l ずつ添加した。T細胞を72時間培養し、細胞の増殖率でIL-1活性を求めた。細胞増殖は培養終了4時間前に、3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミドを添加し生細胞のミトコンドリアにより還元されて発色する色素の570nmでの吸光度を指標に、遺伝子組み換えヒトIL-1でT細胞の最大増殖を起こさせた場合を増殖度100%とし、IL-1を添加しなかった場合の増殖を0%としてTさいばうの増殖を50%引き起こすときのサンプルの希釈倍率をそのサンプルのユニット数として計算した。

この時下記の式によりJ774-1細胞のLPS $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激時のIL-1産生に対して本発明の化合物の抑制率を算定した。結果を表2に示す。

IL-1産生抑制率

$$= \frac{\text{対照群のIL-1ユニット数} - \text{化合物処置群のIL-1ユニット数}}{\text{対照群のIL-1ユニット数}} \times 100 (\%)$$

(注：ユニット数は「ユニット/ml」)

表2

	対照群に対するIL-1産生抑制率
実施例2の化合物	41.7%

実施例18.

ウサギ膝関節の軟骨を分離・培養し、IL-1刺激を行うと軟骨細胞の主要構成成分である糖タンパク質のプロテオグリカンが遊離する。この作用を指標とし、本発明の化合物のIL-1抑制作用を以下の通り測定した。

ニュージーランドホワイト種の雄性ウサギ、生後3週齢、体重250g~300gのものを、ジエチルエーテル麻酔下に脱血致死

し、膝関節を分離した。膝関節よりメスで軟骨部分を切り出し、0.14 M塩化ナトリウム、4 mM塩化カリウム、0.4 mMリン酸二水素ナトリウム、12 mM炭酸水素ナトリウム、0.2 mMリン酸二水素カリウム、11 mMブドウ糖からなるCMF溶液に浸しておいた。この軟骨を0.1% EDTAに入れ37℃、20分間インキュベートした。上清を除去した後、0.15%トリプシンを添加し37℃、60分間インキュベートした。CMF溶液で3回洗浄した後0.15%コラゲナーゼを入れ更に37℃、105分間処理した。軟骨組織片をピペティングで軟骨細胞に単離させ、120 μ mのナイロンメッシュを通した後、4℃、500 g、7分間遠心し軟骨細胞を得た。細胞を3回洗浄し10%牛胎児血清を含むダルベッコMEM培地に 1.2×10^5 個/mlとなるように細胞を浮遊させた。48ウエルプレートに細胞を250 μ lずつ入れコンフルエントに達するまで5日間培養した。その後培養液を0.3%牛胎児血清を含むダルベッコMEMに交換してさらに24時間培養したのち³⁵Sラベルした無機硫酸を185キロボクレルの濃度で添加し24時間培養した。細胞をダルベッコMEM培地で3回洗浄した後、培地を0.1%牛血清アルブミンを含むBGJb培地に交換し、遺伝子組み替え型ヒトIL-1 β を30ユニット/mlの濃度で添加した。同時に本発明の化合物を滅菌蒸留水に溶解し、最終濃度100 μ Mで添加した。IL-1刺激後24時間後に培養上清、並びに細胞層を採取した。

細胞層はプロナーゼEを200 μ g添加し、37℃、24時間処理して分解した。培養上清には0.1 mg/mlコンドロイチン硫酸を0.05 ml、2 mM硫酸マグネシウムを0.5 ml、5 mM塩化カルシウム0.2 Mトリス塩酸緩衝液溶液(pH 7.8) 0.5 ml、1%塩化セチルピリジニウム20 mM塩化ナトリウム溶液

0.5 ml を順次添加し、37℃ 2 時間処理して析出したプロテオグリカンを経過フィルターに集め液体シンチレータを加え、液体シンチレーションカウンタでカウントした。

細胞層には 0.1 mg/ml コンドロイチン硫酸を 0.05 ml、2 mM 硫酸マグネシウムを 0.5 ml、1% 塩化セチルピリジニウム 20 mM 塩化ナトリウム溶液 0.5 ml を順次添加し、37℃ 2 時間処理して析出したプロテオグリカンを経過フィルターに集め液体シンチレータを加え、液体シンチレーションカウンタでカウントした。

それぞれ得られたカウントを最初に添加した無機硫酸のカウントで割りパーセントとして表した。得られた結果はスチューデントの t-検定を用い、無刺激対照群に対して危険率 $P < 0.01$ で有意のものを \$\$ 印を、IL-1 刺激対照群に対して危険率 $P < 0.01$ で有意のものを ** 印で示した。表 3 に示すように本発明の化合物は、IL-1 刺激での細胞層からのプロテオグリカン遊離を抑制し、IL-1 抑制薬として有用である。

表 3

	細胞上清	細胞層
無刺激	0.63 ± 0.035	0.45 ± 0.036
IL-1 刺激	1.06 ± 0.018 \$\$	0.11 ± 0.004 \$\$
IL-1 刺激 + 化合物処理 (実施例 2 の 化合物)	0.78 ± 0.015 **	0.31 ± 0.011 **

実施例 19.

好中球は生体防御反応として、異物を排除するために異物を貪食し、活性酸素や消化酵素を産生することが知られている。しかしながら慢性炎症時などには好中球の産生した活性酸素や消化酵素が正

常組織をも障害し、さらに炎症を増強することが考えられる。そこでヒト好中球からの活性酸素放出に対する本発明の化合物の作用を以下のように測定した。

3. 8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として使用し、ヒト静脈より50ml採血した。この血液と2%デキストラン生理食塩液溶液を等量ずつ混和し、数回振とうした後37℃、30分静置した。上層を分離し、等量のFicoll-Paque液上に重層した。20℃、1400回転で30分間遠心した後の沈澱をとり、ハンス緩衝液で細胞を再浮遊して、さらに20℃、1000回転、5分間遠心して細胞を洗浄した。混入した赤血球は浸透圧ショックをかけて除き、最終的に好中球を 1×10^6 個/mlの濃度にハンス緩衝液に浮遊させる。この好中球 1×10^5 個と刺激剤であるホルミルーメチオニルーロイシルーフェニルアラニン(fMLP) 10^9 Mを37℃でインキュベートし、同時に本発明の化合物を添加して産生した活性酸素を測定した。活性酸素測定には2-メチルー6-フェニルー3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2a]ピラジン-3-オン(CLA)が活性酸素と反応して、励起カルボニル体となりこれが基底状態に遷移する過程で380nmで発光する現象を利用し、ルミノメーターで最大発光量を求めた。下記の式により活性酸素産生抑制率を算定した。結果を表4に示す

活性酸素産生抑制率

$$= \frac{\text{対照群の最大発光量 (RLU/秒)} - \text{化合物処置群の最大発光量 (RLU/秒)}}{\text{対照群の最大発光量 (RLU/秒)}} \times 100$$

表 4

	活性酸素産生抑制率
実施例 2 の化合物 10 μ M	29.4 $\pm$ 6.58 %

実施例 20.

骨粗鬆症病態時には、骨形成と骨破壊のバランスが崩れ、骨破壊が亢進している状態にあると考えられる。骨破壊は破骨細胞の活性化や数の増加により生じると考えられており、そのモデルとして象牙片上にマウス骨細胞を蒔き、活性型ビタミンD₃刺激で骨吸収を生じさせる実験がある。このモデルを用いて本発明の化合物の骨吸収抑制作用について測定した。

生後10～15日齢のICR系のマウスから大腿骨および脛骨を分離して、5%牛胎児血清を含む α -MEM培地中で細切し、骨髓細胞と骨基質を含む骨細胞浮遊液を調製した。骨の大きな破片はナイロンメッシュで除き、生細胞をトリパンブルー排除法染色で、破骨細胞を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色で染色し、破骨細胞を0.05～0.1%程度の割合で含む細胞浮遊液を調製した。象牙は低速回転ダイヤモンドカッターにより150 μ mの厚さに切断し、96ウェルプレートのウェルの大きさに合わせてパンチで打ち抜いた。これらの象牙片を96ウェルプレートに入れ、その上に上記で調製した細胞浮遊液を、破骨細胞がウェルあたり500個入るように入れた。活性型ビタミンD₃の10 nMを刺激剤として添加し、同時に本発明の薬剤を10 μ Mおよび100 μ Mの濃度で添加した。37℃、10%CO₂環境下で細胞を培養し4日後に、象牙片上に形成された吸収窩をヘマトキシリンにて染色して顕微鏡下に観察して、計数した。下記の式により吸収窩形成抑制率を算定した。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{対照群で生じた吸収窩数} - \text{化合物群で生じた吸収窩数}}{\text{対照群で生じた吸収窩数}} \times 100$$

結果を表5に示す。結果はスチューデントのt-検定で統計計算を行い、活性型ビタミンD₃刺激対照群に対して危険率 $P < 0.05$ で有意のものに*印を、 $P < 0.01$ で有意のものに**印を付した。

表5

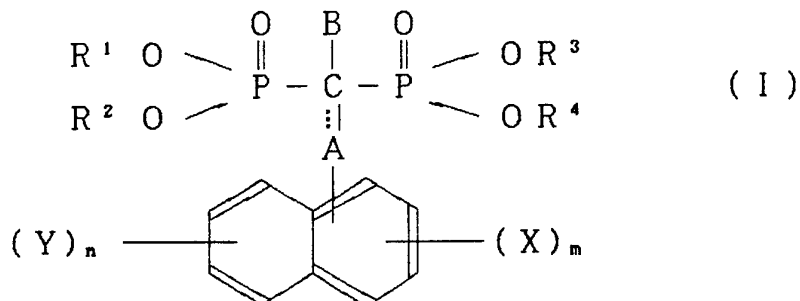
	対照群に対する抑制率(%)
実施例2の化合物 10 μ M	18.8 $\pm$ 6.23
100 μ M	92.1 $\pm$ 0.43**
実施例4の化合物 10 μ M	47.7 $\pm$ 2.18*
100 μ M	94.8 $\pm$ 1.04**
実施例6の化合物 10 μ M	30.6 $\pm$ 12.5
100 μ M	90.8 $\pm$ 1.33**

産業上の利用可能性

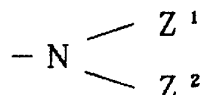
本発明の化合物は、IL-1抑制作用、抗酸化作用、骨吸収抑制作用などにより、抗炎症薬、鎮痛薬、抗リウマチ薬、骨代謝疾患薬、自己免疫疾患薬、感染症薬、皮膚病薬、抗アレルギー薬、抗酸化薬、虚血性臓器障害治療薬として有用である。

請 求 の 範 囲

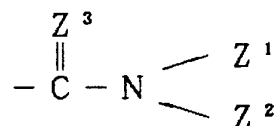
1. 一般式 (I) で示されるメタンジホスホン酸誘導体



[式中、X、Yはナフチル基上の置換基を表わし、ハロゲン、ニトロ基、ニトリル基、アルキル基、アルコキシ基、トリフルオロメチル基、



基（ただし、 Z^1 および Z^2 は互いに独立して、水素、アルキル基を意味し、または、 Z^1 と Z^2 で炭素からなる環またはヘテロ原子を含む炭素からなる環を形成してもよい）、

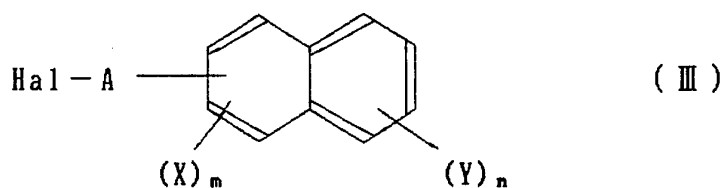


基（ただし、 Z^1 および Z^2 は上記と同じであり、 Z^3 は酸素または硫黄を意味する）、チオール基、水酸基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アシルオキシ基、アシルアミノ基、アシルチオ基、アシル基、アルケニル基、アリール基、シクロアルキル基、 $COOH$ 基、または COO アルキル基を意味し、 m は0～3の整数、 n は0～4の整数を表わし、 m 個のXと n 個のYは、それぞれ同一または異なってもよい。――は二重結合または単結合を表わし、Aは

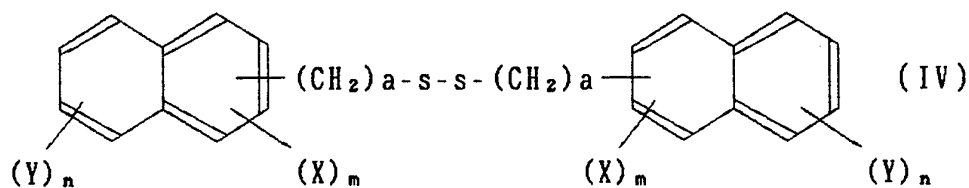
$-(CH_2)_a-(D)_b-(CH_2)_c-$ (Dは硫黄、酸素、NH、アルキル置換Nまたは CH_2 であり、aとcは0～10の整数であり、bは0または1である)、または $-(CH=CH)_d-CH=$ (dは0～2の整数であり、Aが $-(CH=CH)_d-CH=$ を表す場合、Bは存在しない)であり、Bは水素、アルキル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アシルアミノ基、水酸基、アルコキシ基、トリアルキルシロキシ基またはアシルオキシ基を意味する、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、水素、炭素数1～7の直鎖または分岐鎖のアルキル基または薬理的に許容できる陽イオンであり、同一または異なってもよい。]

2. ナフチル基が1-ナフチル基または2-ナフチル基である請求項1記載のメタンジホスホン酸誘導体。

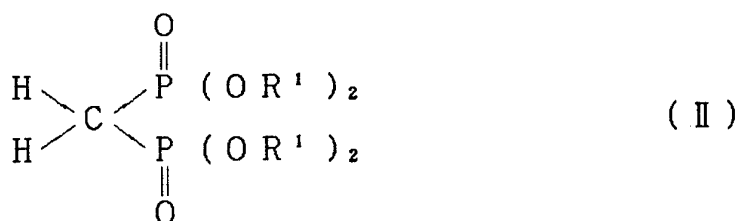
3. 塩基の存在下において、式(III)



(ただし、Halはハロゲンを意味し、X、Y、m、nおよびAは上記と同じ)の化合物または式(IV)



(ただし、X、Y、m、nおよびaは上記と同じ)の化合物を、一般式(II)のジホスホネート化合物



[式中、 R^1 は炭素数 1 ～ 7 の直鎖または分岐鎖のアルキル基であり、同一でも異なってもよい] と反応させ、式 (I) のメタンジホスホン酸誘導体を得ることを特徴とする請求項 1 記載のメタンジホスホン酸誘導体の製造方法。

4. 請求項 1 または 2 記載のメタンジホスホン酸誘導体を有効成分とする抗炎症薬。

5. 請求項 1 または 2 記載のメタンジホスホン酸誘導体を有効成分とする抗リウマチ薬。

6. 請求項 1 または 2 記載のメタンジホスホン酸誘導体を有効成分とする骨代謝疾患薬。

7. 請求項 1 または 2 記載のメタンジホスホン酸誘導体を有効成分とするインターロイキン-1 抑制薬。

8. 請求項 1 または 2 記載のメタンジホスホン酸誘導体を有効成分とする抗酸化薬。

9. 請求項 1 または 2 記載のメタンジホスホン酸誘導体を有効成分とする骨吸収抑制薬。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C07F9/38, C07F9/40, A61K31/66, A61K31/675

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C07F9/38, C07F9/40, A61K31/66, A61K31/675

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, A, 3-112994 (Shinfa SA.), May 14, 1991 (14. 05. 91), Claim; line 15, upper left column to line 4, upper right column, page 5 & EP, A1, 418064 & CA, A, 2025268	1-9
X	JP, A, 61-503034 (Leo Pharmaceutical Products, Ltd. A/S (Loevens Kemiske Fabrik Produktionsaktieselskab), December 25, 1986 (25. 12. 86), Claim; lines 5 to 9, upper right column, page 5, examples 22, 26 & WO, A1, 86/0902 & EP, A1, 191044 & US, A, 4732998	1-9
X	JP, A, 58-174393 (Shering AG.), October 13, 1983 (13. 10. 83), Claim; line 14, lower right column, page 5 to line 10, upper left column, page 6, examples 2, 9 & EP, A1, 84822 & US, A, 4503094 & CA, A, 1224459	1-2, 4-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 2, 1993 (02. 03. 93)

Date of mailing of the international search report

March 23, 1993 (23. 03. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00014

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, A, 58-174394 (Shering AG.), October 13, 1983 (13. 10. 83), Claim; line 9, lower left column to line 8, lower right column, page 3, examples 15 to 18 & EP, A1, 85321 & US, A, 4473560 & CA, A, 1202635	1-2, 4-9
A	JP, A, 63-185993 (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), August 1, 1988 (01. 08. 88), Claim; lines 1 to 7, lower right column, page 3 (Family: none)	1-2, 4-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁸ C07F9/38, C07F9/40, A61K31/66, A61K31/675		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁸ C07F9/38, C07F9/40, A61K31/66, A61K31/675		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAS ONLINE		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, A, 3-112994 (シンファ・ソシエテ・アノニム) 14. 5月. 1991 (14. 05. 91) 特許請求の範囲, 5頁左上欄15行-右上欄4行& EP, A1, 418064 & CA, A, 2025268	1-9
X	JP, A, 61-503034 (レオ・ファーマシューティカル・プロ ダクツ・リミテッド・エイ/エス (レーベンス・ケミスケ・ファブリック ・プロデュクチオンスアクチーセルスカブ) 25. 12月. 1986 (25. 12. 86) 請求の範囲, 5頁	1-9
☒ C欄の続きにも文献が列举されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02. 03. 93	国際調査報告の発送日 23.03.93	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 塚 中 哲 雄	4 H 9 1 6 0 3 4 4 3
電話番号 03-3581-1101 内線		

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	右上欄 5 行 - 9 行, 実施例 22, 実施例 26 &WO, A1, 86/0902&EP, A1, 191044 &US, A, 4732998	
X	JP, A, 58-174393 (シェーリング・アクチエンゲ ゼルシャフト) 13. 10月. 1983 (13. 10. 83) 特許請求の範囲, 5 頁右下欄 14 行 - 6 頁左上欄 10 行, 例 2, 例 9 &EP, A1, 84822&US, A, 4503094 &CA, A, 1224459	1-2, 4-9
X	JP, A, 58-174394 (シェーリング・アクチエンゲ ゼルシャフト) 13. 10月. 1983 (13. 10. 83) 特許請求の範囲, 3 頁左下欄 9 行 - 右下欄 8 行, 例 15 - 例 18 &EP, A1, 85321&US, A, 4473560 &CA, A, 1202635	1-2, 4-9
A	JP, A, 63-185993 (山之内製薬株式会社) 1. 8月. 1988 (01. 08. 88) 特許請求の範囲, 3 頁 右下欄 1 行 - 7 行 (ファミリーなし)	1-2, 4-9