

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5452932号
(P5452932)

(45) 発行日 平成26年3月26日 (2014. 3. 26)

(24) 登録日 平成26年1月10日 (2014. 1. 10)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K	31/575 (2006. 01)	A 6 1 K	31/575
A 6 1 P	25/00 (2006. 01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/28 (2006. 01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/14 (2006. 01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	25/02 (2006. 01)	A 6 1 P	25/02

請求項の数 16 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-546508 (P2008-546508)
 (86) (22) 出願日 平成18年12月15日 (2006. 12. 15)
 (65) 公表番号 特表2009-520006 (P2009-520006A)
 (43) 公表日 平成21年5月21日 (2009. 5. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2006/002740
 (87) 国際公開番号 W02007/080270
 (87) 国際公開日 平成19年7月19日 (2007. 7. 19)
 審査請求日 平成21年9月28日 (2009. 9. 28)
 (31) 優先権主張番号 0512947
 (32) 優先日 平成17年12月20日 (2005. 12. 20)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 505342058
 トロフォ
 フランス国, エフー 1 3 2 8 8 マルセイ
 ユ セデックス 9, カーズ 9 3 1, リ
 ユミニー ビオテック アントルプリーズ
 , パルク シアンティフィック ドウ リ
 ユミニー
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

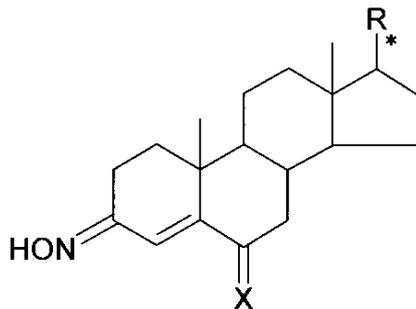
(54) 【発明の名称】 コレストー４－エン－３－オンオキシムの新規誘導体、それを含む医薬組成物及び製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性成分として、少なくとも１つの、式 I :

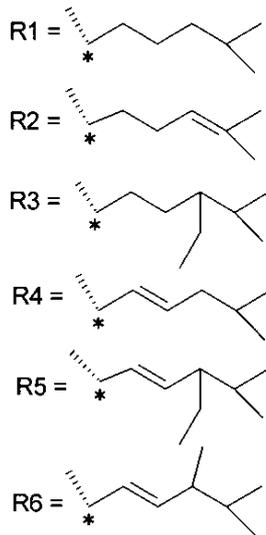
【化 1】



(I)

[式中、Xは酸素原子又は=N-OH基を示し、Rは下記:]

【化2】



10

から選ばれる基を示す。但し、*は結合点を示す。]

で表される化合物、又はその薬学的に許容される酸付加塩、並びに薬学的に許容される賦形剤を含む、神経保護のための医薬組成物。

20

【請求項2】

前記化合物が、3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、3-オキシミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-メチル-3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、コレスト-4-エン-3,6-ジオキシム、コレスト-4,24-ジエン-3,6-ジオキシム、24-エチル-コレスト-4-エン-3,6-ジオキシム、コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、24-エチル-コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、及び24-メチル-コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、又はその薬学的に許容される酸付加塩から選ばれる、請求項1記載の医薬組成物。

30

【請求項3】

前記化合物が、3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、3-オキシミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、及び24-メチル-3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、又はその薬学的に許容される酸付加塩から選ばれる、請求項1又は2記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記化合物が、3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン又は24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、又はその薬学的に許容される酸付加塩である、請求項1～3のいずれか1項記載の医薬組成物。

40

【請求項5】

前記化合物が、3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、又はその薬学的に許容される酸付加塩である、請求項4記載の医薬組成物。

【請求項6】

神経保護薬を製造するための、請求項1～5のいずれか1項で定義された化合物の使用。

【請求項7】

前記神経保護薬が、ネクローシス、及び/又は病的アポトーシス及び/又はネクロトーシスの治療又は予防のための医薬である、請求項6記載の使用。

【請求項8】

50

前記神経保護薬が、ニューロンの変性又は死の治療のための医薬である、請求項 6 記載の使用。

【請求項 9】

前記神経保護薬が、神経変性疾患の治療のための医薬である、請求項 6 記載の使用。

【請求項 10】

前記神経変性疾患が、ハンチントン病、遺伝性又は散発性の神経変性慢性疾患、加齢に関連した神経損傷、遺伝性又は損傷性の末梢神経障害、シャルコー・マリー・トゥース病、糖尿病神経障害又は抗癌治療によって引き起こされる障害、癲癇、脳、末梢神経又は脊髄の損傷、脳又は脊髄の虚血、遺伝性、損傷性もしくは加齢に関連した視覚神経の変性又は眼の神経の変性、遺伝性、損傷性もしくは加齢に関連した聴覚神経の変性、肺萎縮症、血管性認知症、運動ニューロンの変性に関連した疾患及び損傷、並びに脊髄萎縮症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄の損傷及び末梢運動神経の損傷から選ばれる、請求項 9 記載の使用。

10

【請求項 11】

前記神経変性疾患が、脊髄性萎縮症又は筋萎縮性側索硬化症である、請求項 9 又は 10 記載の使用。

【請求項 12】

前記神経変性疾患が、小児脊髄筋萎縮症である、請求項 9 又は 10 記載の使用。

【請求項 13】

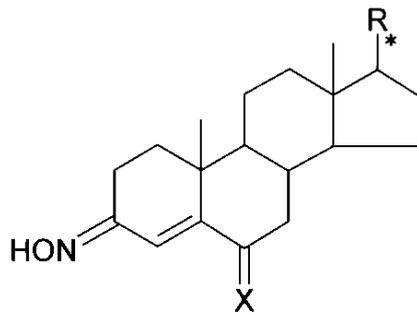
前記神経変性疾患が、多発性硬化症である、請求項 9 又は 10 記載の使用。

20

【請求項 14】

式 I :

【化 3】

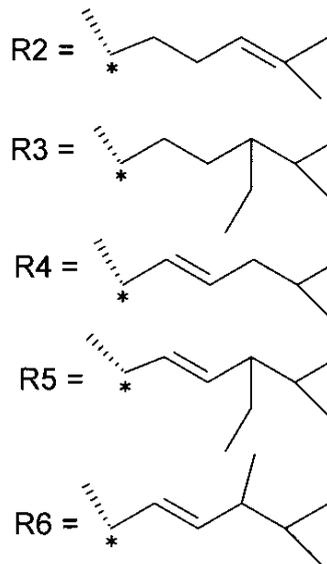


(I)

30

[式中、Xは酸素原子又は=N-OH基を示し、Rは下記：

【化4】



10

から選ばれる基を示す。但し、*は結合点を示す。]

20

で表される化合物、又はその薬学的に許容される酸付加塩。

【請求項15】

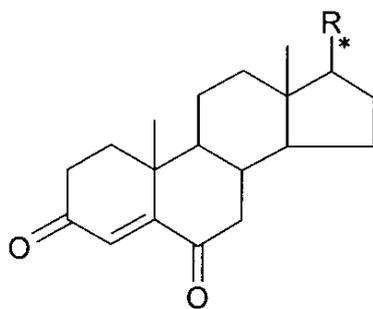
3-オキシイミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシイミノ-コレスト-4-エン-6-オン、3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-メチル-3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、コレスト-4,24-ジエン-3,6-ジオキシム、24-エチル-コレスト-4-エン-3,6-ジオキシム、コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、24-エチル-コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、及び24-メチル-コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシムから選ばれる、請求項14記載の化合物。

【請求項16】

30

式II:

【化5】

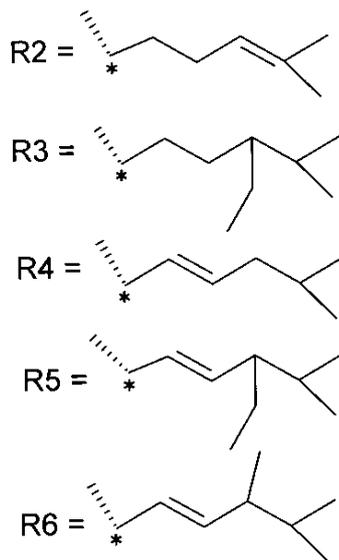


(II)

40

[式中、Xは酸素原子又は=N-OH基を示し、Rは下記:]

【化6】



10

から選ばれる基を示す。但し、*は結合点を示す。

20

で表される化合物を、ヒドロキシルアミンハロゲン化物と反応させることを特徴とする、請求項14又は15記載の化合物、又はその塩の製造法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬、とりわけ細胞保護薬、特に神経保護薬又は心臓保護薬としての、コレスト-4-エン-3-オンオキシムの誘導体の使用に関する。該医薬は、特に、細胞変性又は細胞死に関連した疾患及び損傷、特に、運動ニューロン及び/又は心臓細胞の疾患及び損傷、に好適である。本発明はまた、該化合物を含む医薬組成物、新規誘導体、及びその製造方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

細胞変性プロセスは、望ましくなく細胞活性及び細胞死を頻繁に引き起こす細胞の障害によって特徴付けられる。

【0003】

細胞は、その寿命を長くし、又は細胞死を抑制しさえする、ストレスへの応答における適応メカニズムを生み出してきた(細胞保護メカニズム)。

【0004】

しかしながら、これらの細胞保護メカニズムは、一般的に十分でなく、不適當で、あるいは誘導が非常に遅いため、効率的でなくかつ細胞を死滅させることができない。そのため、それは、細胞保護を促進する新規な細胞保護薬を有するためには興味あるかもしれない。このことは、本発明の課題の1つである。

40

【0005】

細胞死の主なメカニズムの中で、ネクローシスと、アポトーシスとネクロトーシスとの区別は本質的になされる。

【0006】

ネクローシスは、組織に対する損傷の間に起こる、いわゆる「偶発的な」細胞死である。最も影響を受けるのは細胞の原形質膜であり、細胞のホメオスタシスの変化を起こす。細胞は、その原形質膜の溶解を起こす程度で、水を吸収するだろう。この細胞溶解は、周囲の媒体に細胞質内容物を放出させる。ネクローシスは、炎症プロセスの初期にある。

50

【0007】

ネクローシスは、一群の細胞又は組織に影響を与えることがあるが、一方、他の周囲の部分は生存し続ける。得られる形質転換は、細胞又は組織の変化である。

【0008】

言い換えれば、ネクローシスは、細胞が、事象、例えば、重度の損傷、臓器での血液供給の妨害又は減少、温熱療法（温度の顕著な上昇）、化学物質による中毒、物理的ショック等の結果としての寿命の最後に到達する時に起こる形態的な変化によって定義される。

【0009】

最も知られたネクローシスの1つは、冠動脈の閉塞（妨害）に因る心筋梗塞（心筋での血流供給の妨害）である。

10

【0010】

アポトーシスは、生物の通常の生理の不可欠な一部である。それは、高度に制御された細胞死の生理的形態であり、多細胞生物の生存に必要とされる。アポトーシスは、胚形成の間に原始的な役割を果たすプロセスである。

【0011】

アポトーシスの状態にある細胞又はアポトーシス細胞は、他の細胞からそれ自身を離れさせるだろう。アポトーシスは、一般的に、組織中の各々細胞を含み、炎症を起こさない。アポトーシスの特徴的な形態的なポイントの1つは、細胞容積を顕著に減少させる、核と細胞質との顕著な縮合である。次いで、核は、断片化し、各断片は、二重の膜によって囲まれる。次いで、アポトーシス体（細胞質及び核の要素）は放出され、隣接細胞による食作用によって吸収されるだろう。

20

【0012】

アポトーシスは、様々な方法で誘導され得る。例えば、放射線、化学物質又はホルモンの存在は、細胞中のアポトーシス事象のカスケードを誘導することがある刺激である。細胞内シグナルは、例えば不完全な有糸分裂又はDNA損傷もアポトーシスを引き起こすことがある。

【0013】

アポトーシスは、遺伝毒性剤の作用後又は疾患中にも起こる。ある疾患は、ある細胞集団の喪失を招く異常なアポトーシス、例えば、肝細胞毒性、網膜症、心臓毒性によって特徴付けられる。

30

【0014】

そのため、生理的アポトーシスと病的アポトーシスとの区別がなされる。本発明は、本質的に、病的アポトーシスに焦点を当てている。

【0015】

ネクローシス及びアポトーシスの特徴を有する、細胞死の他のメカニズム、例えばネクロトーシスが存在する。ネクロトーシスによって死滅しかかっている細胞は、ネクローシスによって死滅しかかっている細胞の特徴と同様の特徴を有するが、このメカニズムの生物化学的ステップは、アポトーシスのステップとより類似する。細胞死のこのメカニズムは、例えば虚血で起こる。

【発明の開示】

40

【0016】

従って、本発明の目的の1つは、それによって、ネクローシス及び/又は病的アポトーシス及び/又はネクロトーシスを予防及び/又は治療することができる新規な薬（抗-ネクローシス薬及び/又は抗-アポトーシス薬及び/又は抗-ネクロトーシス薬）を製造することである。

【0017】

細胞変性プロセスは、特に、変性疾患又は障害、損傷の条件下、あるいは様々な因子への曝露の条件下で分類された病的状態から起こり得る。

【0018】

これらの損傷及び因子は、例えば、放射線（UV、ガンマ線）、低酸素症又は酸素欠乏、

50

栄養欠如、成長因子の欠如、毒素、細胞毒素、衰弱、環境的な毒素、フリーラジカル、活性酸素への曝露、あるいはある医学的事象及び/又は移植を含む外科的損傷のような処置への曝露を含むことできる。例えば、抗悪性腫瘍薬又は抗-炎症性剤のような、医学的処置の状況での治療薬として用いられる化学的又は生物的な薬剤も挙げられる。

【0019】

変性プロセスによって特徴付けられる最も重要な病的状態の中で、以下のものが見出される：

- ・骨、関節、結合組織及び軟骨の疾患、例えば、骨粗鬆症、骨髄炎、変形性関節症、リウマチ様関節炎及び乾癬性関節炎を含む関節炎、虚血壊死、進行性骨化性線維形成異常症、くる病、クッシング症候群；

10

- ・筋ジストロフィーのような筋疾患、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー症、ミオパシー及び筋無力症；

- ・皮膚疾患、例えば、皮膚炎、湿疹、乾癬、加齢又は瘢痕の変質；

- ・心血管疾患、例えば、心臓及び/又は血管虚血、心筋梗塞、虚血性心臓病、又は急性鬱血性心不全、不整脈、心房性細動、心室細動、発作性頻脈、鬱血性心不全、酸素欠乏症、低酸素症、抗癌剤による治療に起因する二次効果；

- ・循環疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化、末梢血管病、脳血管卒中、動脈瘤；

- ・血液病及び血管疾患、例えば、貧血、血管性アミロイド沈着症、出血、ドレパノサイトーシス (drepanocytosis)、赤血球破碎症候群、好中球減少症、白血球減少症、髄質形成不全、全血球減少症 (pantocytopenia)、血小板減少症、血友病；

20

- ・肺炎、喘息を含む肝臓疾患；閉塞性慢性肺疾患、例えば、慢性気管支炎及び気腫；

- ・胃腸管疾患、例えば、潰瘍；

- ・ウイルス性の肝炎及び肝硬変を含む肝疾患、毒素又は薬物による肝疾患；

- ・膵臓疾患、例えば、急性又は慢性の膵炎；

- ・代謝性疾患、例えば、糖尿病及び尿崩症、甲状腺炎；

- ・腎臓疾患、例えば、急性腎不全又は糸球体腎炎；

- ・ウイルス及び細菌の感染、例えば、敗血症；

- ・化学物質、毒素又は医薬による重度の中毒；

- ・後天性免疫不全症状群 (AIDS) に関連した変性疾患；

30

- ・加齢に関連した疾病、例えば、促進老化症候群；

- ・炎症性疾患、例えば、クーロン病、リウマチ様多発性関節炎；

- ・自己免疫疾患、例えば、紅斑性狼瘡；

- ・組織の劣化から起こる疾患のような歯の疾患、例えば、歯周炎；

- ・眼科疾患又は疾病、例えば、糖尿病網膜症、緑内障、黄斑変性症、網膜変性症、網膜色素変性症、網膜穴又は網膜裂傷、網膜剥離、網膜虚血、損傷に関連した急性網膜症、炎症性変性症、術後合併症、医薬網膜症、白内障；

- ・聴管の疾病、例えば、抗生物質によって起こる耳硬化症及び難聴；

- ・ミトコンドリアに関連した疾患 (ミトコンドリア病)、例えば、フリードリヒ失調症、構造的ミトコンドリア異常を伴う先天性筋ジストロフィー、あるミオパシー (MELAS 症候群、MERFF 症候群、ピアソン症候群)、MIDD 症候群 (ミトコンドリア糖尿病及び難聴)、ウォルフラム症候群、ジストニー。

40

【0020】

更に、神経変性プロセスは、脳 (中枢神経系、CNS)、脊髄及び末梢神経系 (PNS) によって介在される神経機能の喪失を起こすニューロンの障害又はニューロン死によって特徴付けられる。それらは、すなわち、神経変性疾患又は障害、損傷、あるいは毒素への曝露の条件下に分類された病的状態から起こり得る。

【0021】

神経変性プロセスによって特徴付けられる最も重要な疾患は以下である：

- 遺伝性又は散発性の神経変性慢性疾患、特に、アルツハイマー病、ハンチントン病、

50

パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄萎縮症、クロイツフェルト・ヤコブ病、多発性硬化症、アドレノロイコジストロフィー、癲癇、痴呆、統合失調症、AIDSに関連した神経症候群；

- 加齢に関連した神経損傷；
- 遺伝性又は損傷性の末梢神経障害、例えば、ファブリー病、シャルコー・マリー・トゥース病、クラッペ病、白質ジストロフィー、糖尿病性ニューロパチシー、及び抗癌資料によって起こる障害；
- 脳、末梢神経又は脊髄の損傷；
- 脳血管卒中の結果としての又は血液灌流の欠如によって起こる、脳又は脊髄の虚血；
- 遺伝性、損傷性もしくは加齢に関連した視覚神経の変性、例えば、黄斑変性症、網膜色素変性症、又は緑内障によって起こる眼の神経の変性；
- 聴力の低下又は喪失を起こす、遺伝性、損傷性もしくは加齢に関連した聴覚神経の変性。

10

【0022】

これらの疾患に影響を及ぼすシグナル化経路の一部は、非常に多くの神経変性疾患に共通している。アルツハイマー病は、最も一般的な痴呆である。それは、脳萎縮症の兆候、「アモンの角」のニューロンの顕著な喪失を引き起こし、そしてコリン作用性ニューロンに影響も与える。他の疾患、例えば肺葉性萎縮症（ピック病、クロイツフェルト・ヤコブ病）、レビー小体症、血管性痴呆、パーキンソン病は、これらの痴呆の症候の原因において、重大なニューロン死に関連している。

20

【0023】

現在、神経変性を調べる有効な処置はない。ニューロンを死から保護するための治療的方法は、神経栄養タンパク質の供給である。

【0024】

これらのタンパク質、例えば、NDNF（脳由来神経栄養因子）、CNTF（毛様体神経栄養因子）、NGF（神経成長因子）、GDNF（グリア由来神経栄養因子）は、胚発生の間に又は成人での損傷後に合成される。これらの成長因子は、神経細胞の生存、成熟及び分化を促進する。更に、これらの成長因子は、アポトーシスメカニズムを阻害し、複数の生存ルートを活性化し、非常に多数の神経集団を保護する。それらの使用は、ほとんどの神経変性において提案されている。

30

【0025】

神経栄養因子の発現を活性化し、又はこれらの因子の作用を真似た化合物は、神経変性症候群を治療するための治療的潜在力を有する。

【0026】

- 特に、神経変性を治療するための神経栄養分子の提供は、3つの目標に向けられる：
- ニューロンの末梢又は中枢の標的による供給の欠如、及び/又はこれらの因子の逆行輸送の疾患、に関連した神経栄養因子の潜在的な欠乏を補うこと；
 - 変性カスケードに関連する生物化学的ルートにおいて、非-特異的な方法で介在すること；
 - 樹状成長及び神経終焉の樹枝状分岐の自然補償現象（natural compensating phenomena）を促進すること。

40

【0027】

そのため、これらの化合物は、非常に多数の疾患、特に末梢及び中枢神経系に影響を与える疾患において有益な効果を有するだろう。

【0028】

更に、上記の範囲内で、運動ニューロンは、脊髄及び脳系に目立って存在する神経である。その変性又は死は、手足の筋肉の漸進的な衰弱をもたらし、次いで筋肉萎縮症、更に筋肉の痙縮（すなわち、永久的な収縮）の可能をもたらす。

【0029】

脊髄及び/又は延髄の運動ニューロンの変性又は死から起こる最も重要な疾患は、シャ

50

ルコー病又はルー・ゲーリック病としても知られている筋萎縮性側索硬化症、脊髄萎縮症、特にウェルドニヒ・ホフマン病又はクーゲルベルグ・ヴェランダー病としても知られている小児脊髄筋萎縮症である。

【0030】

更に、運動ニューロンの変性は、脊髄又は末梢運動神経の粉碎又は切断による損傷の場合に観察される。

【0031】

より一般的には、脊髄萎縮症の用語は、脊髄の運動ニューロンの変性及び死が関連する疾患に使用される。

【0032】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、ルイス体のような様々な種類の封入体に関連し、脊髄及び皮質の運動ニューロンの変性によって特徴付けられる神経変性疾患であり、その致命的結果は、時には、前頭葉型（frontal）痴呆と関連する。ALSの発症中、神経変性現象は、脳内だけでなく、神経感応の欠如によって脊髄内でも、そして筋肉内でもおこる。

【0033】

活性化化合物は、上記の疾患を制御するために依然として探究されている。ここで、出願人は、コレスト-4-エン-3-オン キシムの誘導体、特に3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オンが顕著な神経保護性及び/又は心臓保護性を与えることを発見した。

【0034】

従って、式Iの化合物の魅力な神経保護性及び心臓保護性は、特に細胞保護薬、最も具体的には神経保護薬又は心臓保護薬を製造するための、それらの医薬としての使用を保証する。

【0035】

用語「細胞保護」は、薬剤、例えば、化学物質（天然又はそうでない）の互いに又は他の組織と細胞との相互作用を維持する能力、細胞死を伴うか又は伴わずに、細胞機能喪失又は望ましくない細胞活性を招く変性現象に対して、及び/又は細胞死を招くか又は招かずに、細胞障害に対して及び/又は細胞障害を招く変性疾患又は障害に対して、細胞を保護する能力を言う。

【0036】

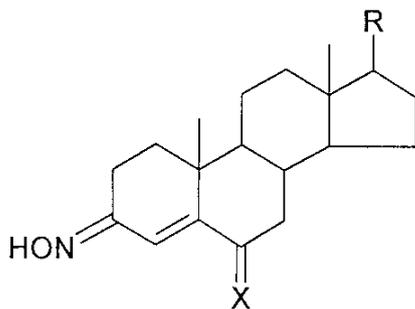
用語「神経保護」又は「心臓保護」は、上記の薬剤と同一の性質を言うが、神経系（「神経保護」）の細胞について特に言うものではなく、又は心臓系（「心臓保護」）の細胞について特に言うものではない。

【0037】

従って、細胞保護又は神経保護もしくは心臓保護化合物が、先に記載のような性質を有する化合物であることが理解される。このような理由により、本発明の目的は、式I：

【0038】

【化1】



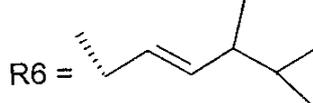
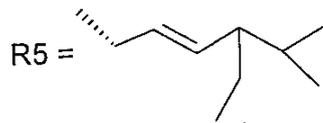
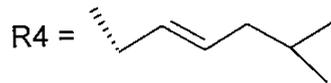
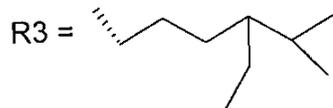
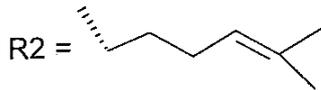
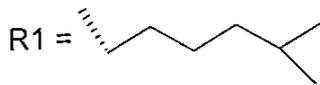
(I)

【0039】

[式中、Xは酸素原子又は=N-OH基を示し、Rは下記：

【0040】

【化2】



10

20

【0041】

から選ばれる基を示す。]

で表される化合物、並びにそのエステル及び/又は薬学的に許容される酸とのその付加塩の医薬としての使用である。

【0042】

薬学的に許容される酸との酸付加塩は、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、シュウ酸、グリオキシル酸、アスパラギン酸、アルカン-スルホン酸、例えばメタン-又はエタン-スルホン酸、アリール-スルホン酸、例えばベンゼン-又はパラトルエン-スルホン酸、又はカルボン酸で形成された塩でよい。

30

【0043】

従って、本発明の目的はまた、コレスト-4-エン-3,6-ジオキシム、コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、コレスト-4,24-ジエン-3,6-ジオキシム、3-オキシイミノ-コレスト-4-エン-6-オン、3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、3-オキシイミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン、24-メチル-3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-メチル-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-エチル-コレスト-4-エン-6-オン、24-エチル-コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、24-エチル-3-オキシイミノ-コレスト-4-エン-6-オン、24-エチル-3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩の医薬としての使用である。

40

【0044】

上記の化合物の中で、医薬として好ましく使用できる式Iの化合物は、特に、Xが酸素原子を示すもの、すなわち、3-オキシイミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン、3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-メチル-3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシイミノ-コレスト-4-エン-6-オン、24-エチル-3-オキシイミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩である。

【0045】

50

より具体的には、3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン及び24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩である。

【0046】

最も具体的には、3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩である。

【0047】

上記化合物は非常に魅力的な薬理的性質を有し、これは本発明の目的である。それらは、特に、顕著な細胞保護性、特に神経保護性、最も具体的には運動ニューロンに対して及び心臓保護性を有する。

10

【0048】

これらの性質は、後記の実験項に説明されている。それらは、上記の化合物の使用、及びそのエステル及び/又は薬学的に許容される酸による酸付加塩の使用、並びに細胞保護薬、特に神経保護薬及び/又は心臓保護薬としての使用を保証する。より具体的には、本発明に従う化合物は、運動神経及び末梢神経の運動ニューロン、中枢神経系のニューロンに対して、顕著な活性を有する。

【0049】

本発明の文脈内で、用語「治療」は、予防的、治癒的、苦痛緩和的な治療、及び患者のケア（苦しみを軽減し、寿命を改善し、疾患の進行を遅らせる）等を意味する。治療は、他の物質又は治療、例えば、特に、本願で特定された疾患又は損傷を治療するための他の活性な化合物、と組み合わせて更に行うことができる。

20

【0050】

本発明に従う化合物は、その細胞保護性によって、ネクローシス及び/又は病的アポトーシス及び/又はネクロトーシスの治療又は予防、あるいは以下の疾患：

- ・骨、関節、結合組織及び軟骨の疾患、例えば、骨粗鬆症、骨髄炎、変形性関節症、リウマチ様関節炎及び乾癬性関節炎を含む関節炎、虚血壊死、進行性骨化性線維形成異常症、くる病、クッシング症候群；
- ・筋ジストロフィーのような筋疾患、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー症、ミオパシー及び筋無力症；
- ・皮膚疾患、例えば、皮膚炎、湿疹、乾癬、加齢又は癬痕の変質；
- ・心血管疾患、例えば、心臓及び/又は血管虚血、心筋梗塞、虚血性心臓病、又は急性鬱血性心不全、不整脈、心房性細動、心室細動、発作性頻脈、鬱血性心不全、酸素欠乏症、低酸素症、抗癌剤による治療に起因する二次効果；
- ・循環疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化、末梢血管病、脳血管卒中、動脈瘤；
- ・血液病及び血管疾患、例えば、貧血、血管性アミロイド沈着症、出血、ドレパノサイトーシス（drepanocytosis）、赤血球破碎症候群、好中球減少症、白血球減少症、髄質形成不全、全血球減少症（pantocytopenia）、血小板減少症、血友病；
- ・肺炎、喘息を含む肝臓疾患；閉塞性慢性肺疾患、例えば、慢性気管支炎及び気腫；
- ・胃腸管疾患、例えば、潰瘍；
- ・ウイルス性の肝炎及び肝硬変を含む肝疾患、毒素又は薬物による肝疾患；
- ・膵臓疾患、例えば、急性又は慢性の膵炎；
- ・代謝性疾患、例えば、糖尿病及び尿崩症、甲状腺炎；
- ・腎臓疾患、例えば、急性腎不全又は糸球体腎炎；
- ・ウイルス及び細菌の感染、例えば、敗血症；
- ・化学物質、毒素又は医薬による重度の中毒；
- ・後天性免疫不全症状群（AIDS）に関連した変性疾患；
- ・加齢に関連した疾病、例えば、促進老化症候群；
- ・炎症性疾患、例えば、クーロン病、リウマチ様多発性関節炎；
- ・自己免疫疾患、例えば、紅斑性狼瘡；

30

40

50

- ・組織の劣化から起こる疾患のような歯の疾患、例えば、歯周炎；
- ・眼科疾患又は疾病、例えば、糖尿病網膜症、緑内障、黄斑変性症、網膜変性症、網膜色素変性症、網膜穴又は網膜裂傷、網膜剥離、網膜虚血、損傷に関連した急性網膜症、炎症性変性症、術後合併症、医薬網膜症、白内障；
- ・聴管の疾病、例えば、抗生物質によって起こる耳硬化症及び難聴；
- ・ミトコンドリアに関連した疾患（ミトコンドリア病）、例えば、フリードリヒ失調症、構造的ミトコンドリア異常を伴う先天性筋ジストロフィー、あるミオパシー（MELAS症候群、MERFF症候群、ピアソン症候群）、MIDD症候群（ミトコンドリア糖尿病及び難聴）、ウォルフラム症候群、ジストニー、

の治療又は予防のための医薬（抗-ネクローシス薬、及び/又は抗-アポトーシス薬、及び/又は抗ネクローシス薬）を製造するために使用することができる。

10

【0051】

最も具体的には、本発明に従う医薬は、その神経保護性によって、例えば、神経変性疾患、例えば、ハンチントン病、遺伝性又は散発性の神経変性慢性疾患、加齢に関連した神経損傷、遺伝性又は損傷性の末梢神経障害、糖尿病神経障害又は抗癌治療によって引き起こされる障害、脳、末梢神経又は脊髄の損傷、脳又は脊髄の虚血、癲癇、遺伝性、損傷性もしくは加齢に関連した視覚神経の変性又は眼の神経の変性、遺伝性、損傷性もしくは加齢に関連した聴覚神経の変性、肺萎縮症、及び血管性認知症、特に、脊髄萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、及び脊髄又は末梢運動神経の損傷に起因する疾患、の治療又は予防において、その使用を見出す。

20

【0052】

特に、運動ニューロンに対するその神経保護性によって、特に、脊髄萎縮症、特に、筋萎縮性側索硬化症又は小児脊髄筋萎縮症の治療、及び上記の脊髄又は末梢運動神経の損傷の治療において、その使用を見出す。

【0053】

一般的に、化合物の1日量は、治療的効果を得るための最小量であろう。この量は、前記の様々な因子に依拠するだろう。上記の化合物、例えば、3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オンの投与量は、一般的に、ヒトでは、0.001~100 mg/kg/日、含まれるだろう。

【0054】

必要であれば、1日量は、2、3、4、5、6又はそれ以上の回数/日で、あるいは1日の間に好適な間隔で投与される複数のより少ない量（subdose）で、投与することができる。

30

【0055】

選択された量は、複数の因子、特に、投与経路、投与時間、投与量、化合物の消失速度、化合物と組み合わせて使用される様々な製品（複数）、年齢、体重、及び患者の健康状態、並びに患者の治療歴、及び医薬において公知の任意の他の情報に依拠するだろう。

【0056】

担当の医師の処方は、一般的に使用される投与量よりも少ない投与量で開始してもよく、次いで、これらの投与量は、一般的に、可能性のある二次効果の発生をうまく制御するために、増加されるだろう。

【0057】

本発明の目的は、少なくとも1つの上記の化合物又はそのエステル1つ、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩を活性成分として含む医薬組成物でもある。

40

【0058】

これらの組成物では、活性成分は、有利には、生理学的に有効量で存在する；上記の組成物は、特に、少なくとも1つの上記の活性成分の有効な神経保護量を含む。

【0059】

医薬として、式Iで表される化合物、並びにそのエステル及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩は、経口的経路又は非経口的経路のための医薬組成物に組み込まれる。

【0060】

50

本発明に従う医薬組成物は、特に、上で定義した、細胞、特に心臓細胞及び/又は運動ニューロンの障害又は細胞死に関連した疾患又は損傷に罹患した対象を治療する際に、少なくとも1つの他の治療上活性な成分を、同時に、別個の使用で又は長時間にわたって、更に含むことがある。

【0061】

本発明に従う医薬組成物又は医薬は、1つ以上の不活性な、すなわち薬学的に不活性かつ非毒性の賦形剤又は担体を有利に含む。例えば、医薬用途に適合しかつ当業者に知られた、生理食塩水、生理的な等張緩衝液などが挙げられる。組成物は、分散剤、溶解剤、安定剤、保存料等から選ばれる、1以上の薬剤又は担体を含むことがある。製剤（液状の及び/又は注射可能な及び/又は固体の製剤）において使用され得る薬剤又は担体は、特に、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、シクロデキストリン、ポリソルビタン酸塩80、マンニトール、ゼラチン、ラクトース、植物油又は動物油、アカシア等である。組成物は、おそらく、原体（galenic form）の手段によって、又は長期間の及び/又は遅れた放出を提供する装置の手段によって、注射懸濁剤、ゲル、オイル、錠剤、座剤、粉剤、ゼラチンカプセル剤、カプセル剤等として製剤化できる。この種の製剤のためには、薬剤、例えばセルロース、炭酸塩又はデンプンが有利に使用できる。

10

【0062】

投与は当業者に公知の任意の方法、好ましくは、経口的に又は注入によって、典型的には腹腔内、大脳内、鞘内、静脈内、動脈内又は筋肉内経路によって行われる。経口投与が好ましい。これが長期間の治療である場合には、好ましい投与経路は舌下、経口又は経皮的であろう。

20

【0063】

注入用では、化合物は、一般的に、液状懸濁剤として包装されている。例えばシリンジ又は灌流の手段によって注入される。流速及び/又は注入量又は一般的に投与される投与量は、患者、病態、投与方法等によって当業者によって採用できることを理解されたい。おそらく他の活性成分又は任意の薬学的に許容される担体（安定剤の存在下に、緩衝剤、生理食塩水、等張液など）と組み合わせて、繰り返し投与も行えることを理解されたい。

【0064】

本発明は、哺乳動物、特にヒトにおいて使用することができる。

30

【0065】

本発明の目的は更に、活性成分（複数）が、それ自体公知の方法に従って許容される賦形剤、特に薬学的に許容される賦形剤と混合されることを特徴とする、上記の組成物の製造方法である。

【0066】

上で定義された式 I の化合物の中には知られているものもあり、又は文献記載の方法に従って製造することができるものもある。しかし、式 I の誘導体の中には、新規化合物もある。

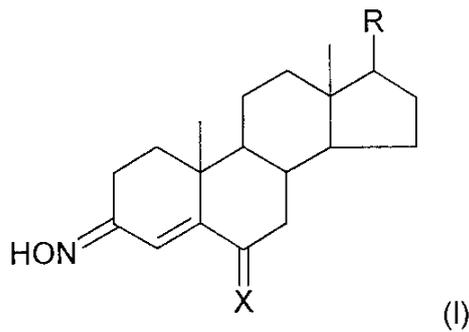
【0067】

このことは、本願の目的が式 I :

40

【0068】

【化3】



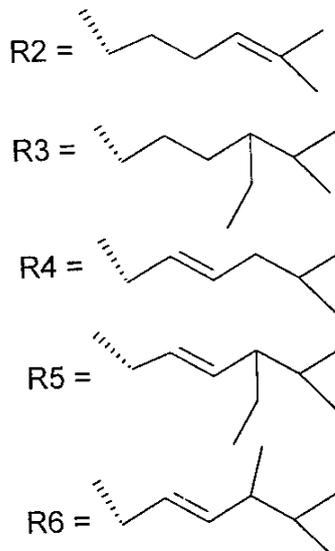
10

【0069】

[式中、Xは酸素原子又は=N-OH基を示し、Rは下記：

【0070】

【化4】



20

【0071】

から選ばれる基を示す。]

で表される新化合物、もしくはそのエステル、及び/又は鉱酸もしくは有機酸の付加塩でもある理由である。

【0072】

従って、本発明の目的は、コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、コレスト-4,24-ジエン-3,6-ジオキシム、3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、3-オキシミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン、24-メチル-3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、24-メチル-コレスト-4,21-ジエン-3,6-ジオキシム、24-エチル-コレスト-4-エン-3,6-ジオキシム、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩から選ばれる、上記式Iで表される化合物である。

40

【0073】

上記の化合物の中で、式Iの化合物は、特に、Xが酸素原子を示すもの、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩、すなわち、3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、3-オキシミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン、24-メチ

50

ル-3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4,21-ジエン-6-オン、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩である。

【0074】

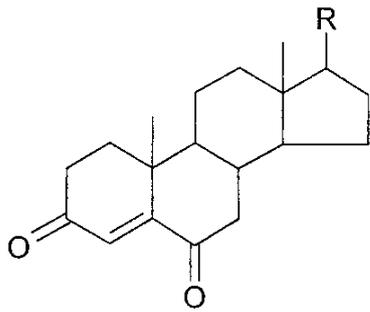
より具体的には、3-オキシミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン及び24-エチル-3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩、更に具体的には、3-オキシミノ-コレスト-4,24-ジエン-6-オン、並びにそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とのその酸付加塩である。

【0075】

本発明の目的は、必要ならば単離され塩化される式Iの予想化合物を得るために、上で定義された式Iの新規化合物、並びにそのエステル及び/又はその塩を調製する方法であって、式II：

【0076】

【化5】



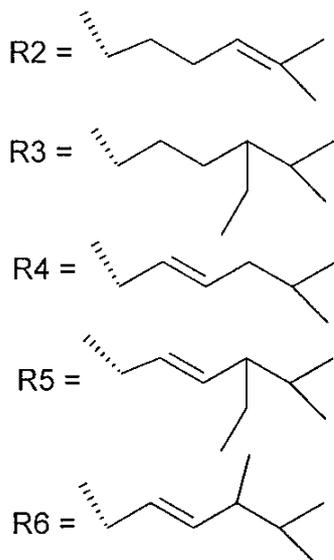
(II)

【0077】

[式中、Rは下記：

【0078】

【化6】



【0079】

から選ばれる基を示す。]

で表される化合物が、ヒドロキシルアミン塩酸塩のようなヒドロキシルアミンハロゲン化物と反応することを特徴とする方法でもある。

【0080】

上記の方法を適用するための好ましい条件下で、

- 出発物質は、少量の、例えばピリジンのような好適な溶媒中に溶解し、
- 主成分の3-オキシミノ-6-オン-化合物を得るために、1等量のヒドロキシルアミンハロゲン化物、又は主成分の3,6-ジオキシム化合物を得るために、過剰量のヒドロキシルアミンハロゲン化物のいずれかを使用し、
- 室温（20～30 ）で24時間攪拌する。

【0081】

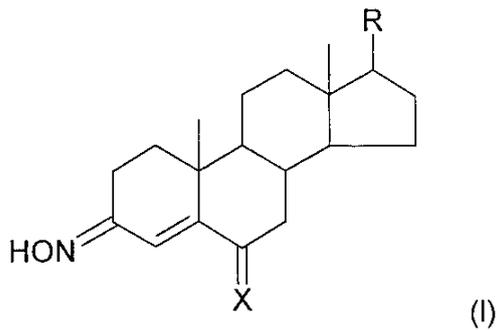
式Iの化合物は、その合成が文献に記載されている、公知の誘導体である。

【0082】

本発明の目的は、更に、細胞保護薬の製造のための、式I：

【0083】

【化7】

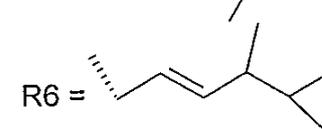
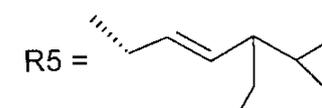
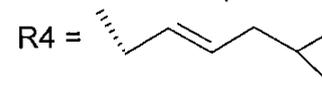
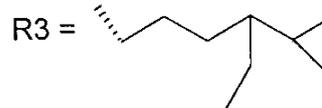
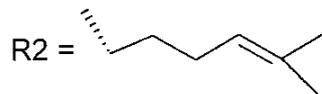
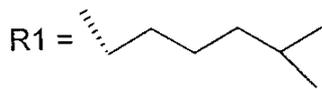


【0084】

[式中、Xは酸素原子又は=N-OH基を示し、Rは式：

【0085】

【化8】



10

20

【0086】

から選ばれる基を示す。]

で表される化合物、もしくはそのエステル、及び/又は薬学的に許容される酸とその付加塩の使用である。

【0087】

特に、本発明の目的は、細胞、特に心臓細胞及び/又はニューロン、の変性もしくは細胞死（後者は自然でも又は偶発的でもよい）に関連した疾患又は損傷の治療又は予防のための医薬を製造するための、上記式Iの化合物の使用である。

【0088】

より具体的には、本発明の目的は、更に、ネクロシス及び/又は病的アポトーシス及び/又はネクローシスの治療又は予防、あるいは以下の疾患：

- ・骨、関節、結合組織及び軟骨の疾患、例えば、骨粗鬆症、骨髄炎、変形性関節症、リウマチ様関節炎及び乾癬性関節炎を含む関節炎、虚血壊死、進行性骨化性線維形成異常症、くる病、クッシング症候群；

- ・筋ジストロフィーのような筋疾患、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー症、ミオパシー及び筋無力症；

- ・皮膚疾患、例えば、皮膚炎、湿疹、乾癬、加齢又は癬痕の変質；

- ・心血管疾患、例えば、心臓及び/又は血管虚血、心筋梗塞、虚血性心臓病、又は急性鬱血性心不全、不整脈、心房性細動、心室細動、発作性頻脈、鬱血性心不全、酸素欠乏症、低酸素症、抗癌剤による治療に起因する二次効果；

- ・循環疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化、末梢血管病、脳血管卒中、動脈瘤；

- ・血液病及び血管疾患、例えば、貧血、血管性アミロイド沈着症、出血、drepanocytosis（drepanocytosis）、赤血球破碎症候群、好中球減少症、白血球減少症、髄質形成不全、全血球減少症（pantocytopenia）、血小板減少症、血友病；

- ・肺炎、喘息を含む肝臓疾患；閉塞性慢性肺疾患、例えば、慢性気管支炎及び気腫；

- ・胃腸管疾患、例えば、潰瘍；

- ・ウイルス性の肝炎及び肝硬変を含む肝疾患、毒素又は薬物による肝疾患；

- ・膵臓疾患、例えば、急性又は慢性の膵炎；

30

40

50

- ・代謝性疾患、例えば、糖尿病及び尿崩症、甲状腺炎；
- ・腎臓疾患、例えば、急性腎不全又は糸球体腎炎；
- ・ウイルス及び細菌の感染、例えば、敗血症；
- ・化学物質、毒素又は医薬による重度の中毒；
- ・後天性免疫不全症状群（AIDS）に関連した変性疾患；
- ・加齢に関連した疾病、例えば、促進老化症候群；
- ・炎症性疾患、例えば、クーロン病、リウマチ様多発性関節炎；
- ・自己免疫疾患、例えば、紅斑性狼瘡；
- ・組織の劣化から起こる疾患のような歯の疾患、例えば、歯周炎；
- ・眼科疾患又は疾病、例えば、糖尿病網膜症、緑内障、黄斑変性症、網膜変性症、網膜色素変性症、網膜穴又は網膜裂傷、網膜剥離、網膜虚血、損傷に関連した急性網膜症、炎症性変性症、術後合併症、医薬網膜症、白内障；
- ・聴管の疾病、例えば、抗生物質によって起こる耳硬化症及び難聴；
- ・ミトコンドリアに関連した疾患（ミトコンドリア病）、例えば、フリードリヒ失調症、構造的ミトコンドリア異常を伴う先天性筋ジストロフィー、あるミオパシー（MELAS症候群、MERFF症候群、ピアソン症候群）、MIDD症候群（ミトコンドリア糖尿病及び難聴）、ウォルフラム症候群、ジストニー、
- ・神経変性疾患、例えば、ハンチントン病、遺伝性又は散発性の神経変性慢性疾患、加齢に関連した神経損傷、遺伝性又は損傷性の末梢神経障害、シャルコー・マリー・トゥース病、糖尿病神経障害又は抗癌治療によって引き起こされる障害、癲癇、脳、末梢神経又は脊髄の損傷、脳又は脊髄の虚血、遺伝性、損傷性もしくは加齢に関連した視覚神経の変性又は眼の神経の変性、遺伝性、損傷性もしくは加齢に関連した聴覚神経の変性、肺萎縮症、血管性認知症、運動ニューロンの変性に関連した疾患及び損傷、並びに脊髄萎縮症、特に小児脊髄筋萎縮症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄の損傷、及び末梢運動神経の損傷、の治療又は予防のための医薬（抗-ネクロトーシス薬、及び/又は抗-アポトーシス薬、及び/又は抗ネクロトーシス薬）を製造するための、上記式Iの化合物の使用である。

【0089】

最も具体的には、本発明の目的は、特に小児脊髄筋萎縮症及び筋萎縮性側索硬化症の治療のための医薬の製造における式Iの化合物の使用である。

【0090】

これらの医薬の適用は、通常、特に、細胞、特に、心臓細胞及び/又はニューロンの生存を増加させるために、あるいは軸策成長を促進するために、式Iの化合物、特に3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オンの治療上有効量の、患者、特に哺乳動物、最も特にヒトへの投与を含む。

【0091】

本発明の目的は、3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オンの治療上有効量のこれらの哺乳動物への投与を含む、特にニューロン生存を増加させ又は軸策成長を促進するための、疾患又は損傷に罹患した哺乳動物（一般的に患者）における、上記の疾患、特に神経変性疾患を治療するための方法、及び特に、ニューロンの変性もしくは死に関連した疾患又は損傷を治療するための方法である。

【0092】

更に、本発明の目的は、式Iの化合物の治療上有効量のこれらの哺乳動物（一般的に患者）への投与を含む、特に、ニューロン生存を増加させるための、上記の疾患の1つ、及び疾患又は損傷に罹患した哺乳動物（一般的に患者）における運動ニューロンの変性もしくは死に関連した疾患又は損傷を治療するための方法である。より具体的には、運動ニューロンの変性又は死に関連した疾患は、筋萎縮性側索硬化症又は小児脊髄筋萎縮症である。

【0093】

以下の実施例は、本発明を説明するものであり、限定するものではない。

【実施例】

【0094】

実施例 1 :

懸濁液を以下の組成で調製した。

3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン	20 mg/mL
賦形剤	オレイン酸
保存料	メチルパラベン

【0095】

実施例 2 :

軟ゼラチンカプセルは、以下の組成で調製した。

3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン	250 mg
賦形剤	750 mgのゼラチンカプセルを充填するために十分な量

10

【0096】

実施例 3 : 3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オン (R=R1) の製造

250 mLのフラスコ中で、2.8 gのコレスト-4-エン-3,6-ジオン (7.03 mmol) を0 で90 mLのピリジン中で溶解し、次いで489 mg (7.3 mmol) のヒドロキシルアミン塩酸塩を加えた。溶液を12時間攪拌し、室温まで徐々に昇温した。1 M HCl溶液を加え、抽出を行うためにジエチルエーテルを加えた。有機相をMgSO₄上で乾燥した。濾過後、ジエチルエーテルを減圧下に濃縮した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (25/75 ジエチルエーテル/石油エーテル) で精製を行い、次いで得られた固体をジイソプロピルエーテルで洗浄した。3-オキシミノ-コレスト-4-エン-6-オンを白色固体 (530 mg, 1.28 mmol, 18%) として得た。R_f=0.58 (70/30 (ジエチルエーテル/石油エーテル))。

20

【0097】

分析 :

液体クロマトグラフィー/質量スペクトル (Electrospray (登録商標))

高速液体クロマトグラフィーの条件 :

カラム : Thermo-Hypersil Hyperprep - RP C 18 8 μm - 150 × 4.6 mm

グラジエント : 水 (+0.05% TFA) / アセトニトリル (+0.05% TFA)

t=0分 : 80%アセトニトリル、20% H₂O

t=15分 : 95%アセトニトリル、5% H₂O

t=27分 : 95%アセトニトリル、5% H₂O

保持時間 : 20.32分 (1分の100分の1の単位)

質量スペクトルで検出されたピーク : {M+H}⁺ = 414。

30

【0098】

実施例 4 ~ 8 :

以下の化合物は、実施例 3 で用いた方法と同一の方法に従って製造した。

【0099】

【表 1】

実施例 番号	製造化合物	出発化合物
4 (R=R2)	3-オキシミノ-コレスト-4, 24- ジエン-6-オン	コレスト-4, 24-ジエン-3, 6-ジオン
5 (R=R3)	24-エチル-3-オキシミノ-コレスト -4-エン-6-オン	24-エチル-コレスト-4-エン-3, 6- ジオン
6 (R=R4)	3-オキシミノ-コレスト-4, 21- ジエン-6-オン	コレスト-4, 21-ジエン-3, 6-ジオン
7 (R=R5)	24-エチル-3-オキシミノ-コレスト -4, 21-ジエン-6-オン	24-エチル-コレスト-4, 21-ジエン- 3, 6-ジオン
8 (R=R6)	24-メチル-3-オキシミノ-コレスト -4, 21-ジエン-6-オン	24-メチル-コレスト-4, 21-ジエン- 3, 6-ジオン

10

【 0 1 0 0 】

実施例 9 : コレスト-4-エン-3,6-ジオキシム (R=R1) の製造

250 mLのフラスコ中で、2.8 gのコレスト-4-エン-3,6-ジオン (7.03 mmol) を0 で90 mLのピリジン中で溶解し、次いで1,467 mg (21.09 mmol) のヒドロキシルアミン塩酸塩を加えた。溶液を12時間攪拌し、室温まで徐々に昇温した。1 M HCl溶液を加え、抽出を行うためにジエチルエーテルを加えた。有機相をMgSO₄上で乾燥した。濾過後、ジエチルエーテルを減圧下に濃縮した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (40/60 ジエチルエーテル/石油エーテル) で精製を行い、次いで得られた固体 (778 mg) をジイソプロピルエーテルで洗浄した。コレスト-4-エン-3,6-ジオキシムを白色固体 (487 mg, 1.14 mmol, 16%) として得た。R_f=0.21 (70/30 (ジエチルエーテル/石油エーテル))。

20

【 0 1 0 1 】

分析:

液体クロマトグラフィー/質量スペクトル (Electrospray (登録商標))

高速液体クロマトグラフィーの条件:

カラム: Thermo-Hypersil Hyperprep - RP C 18 8 μm - 150 × 4.6 mm

グラジエント: 水 (+0.05% TFA) / アセトニトリル (+0.05% TFA)

t=0分: 80%アセトニトリル、20% H₂Ot=15分: 95%アセトニトリル、5% H₂Ot=27分: 95%アセトニトリル、5% H₂O

保持時間: 15.71分及び17.61分 (1分の100分の1の単位)

質量スペクトルで検出されたピーク: {M+H}⁺ = 429。

30

【 0 1 0 2 】

実施例 10 ~ 14 :

以下の化合物は、実施例 9 で用いた方法と同一の方法に従って製造した。

40

【 0 1 0 3 】

【表 2】

実施例 番号	製造化合物	出発化合物
10 (R=R2)	コレスト-4, 24-ジエン-3, 6-ジオキシム	コレスト-4, 24-ジエン-3, 6-ジオン
11 (R=R3)	24-エチル-コレスト-4-エン-3, 6- ジオキシム	24-エチル-コレスト-4-エン-3, 6- ジオン
12 (R=R4)	コレスト-4, 21-ジエン-3, 6-ジオキシム	コレスト-4, 21-ジエン-3, 6-ジオン
13 (R=R5)	24-エチル-コレスト-4, 21-ジエン-3, 6- ジオキシム	24-エチル-コレスト-4, 21-ジエン- 3, 6-ジオン
14 (R=R6)	24-メチル-コレスト-4, 21-ジエン-3, 6- ジオキシム	24-メチル-コレスト-4, 21- ジエン-3, 6-ジオン

10

【0104】

薬理的試験

以下の方法に従って化合物を試験した。

実施例 15：運動ニューロンの生存に対する式 I の化合物の効果

20

式 I の化合物の神経保護作用を証明するために、出願人は、ラット運動ニューロンの *in vitro* 栄養欠乏モデルでのその活性を試験した。脊髄運動ニューロンの培養に関する出願人の特許出願 WO 0142784 に言及するのは役に立つかもしれない。

【0105】

E14ラット胚の脊髄を切開し、腹部分をトリプシン処理後に件和によって分解した。運動ニューロンを公知の方法 (Camu et al., 1993, イムノパニングによるトリ及びラット胚からの脊髄運動ニューロンの精製) によって他の脊髄細胞から分離した。神経細胞培養のための免疫選択法において、神経プロトコール: A companion to Methods in Neurosciences 2, 191-199; Henderson et al., 1993, ニュートロフィンは、運動ニューロンの生存を促進し、胚芽芽に存在する, Nature 363 (6426): 266-70)。細胞を密度グラジエントで遠心した。運動ニューロンは、大きな(密度の低い)細胞の分画に富んでいた。この分画の細胞を抗-p75抗体、運動ニューロン上にある表面抗原でインキュベートした。磁気ビーズと結合した二次抗体を加え、細胞混合物をマグネットでカラムを通過させた (Arce et al., 1999, カーディオトロフィン-1は、新規方法によって精製されたマウスの運動ニューロンの生存を促進するためにLIFRベータを必要とする, J. Neurosci Res 55(1): 19-26)。運動ニューロンのみが保持され、その純度は、90%のオーダーであった。

30

【0106】

運動ニューロンは、Raoul et al., 1999, Fas死亡レセプターによって引き起こされた胚運動ニューロンのプログラムされた細胞死, J. Cell. Biol. 147(5): 1049-62に従って補充されたNeurobasal培地 (GIBCO) 中のポリオルニチン-ラミニン基質上に、培養ウェル中で、低密度で播種した。陰性(栄養因子非存在)対照、並びに米国のPEPROTECH社及びシグマ・アルドリッチ社によって市販されている、陽性対照(1 ng/mlのBDNF(脳由来神経栄養因子)、1 ng/mlのGDNF(グリア由来神経栄養因子)及び10 ng/mlのCNTF(毛様体神経栄養因子)を各シリーズに含んだ。

40

【0107】

試験する化合物を播種後60分に加え、培養を5% CO₂下、37 °Cで3日間維持した。

【0108】

運動ニューロンは、神経栄養因子の非存在下で自発的に死滅する傾向にある (Pettmann and Henderson, 1998, Neuronal cell death. Neuron 20(4): 633-47)。3日後、生細胞中で蛍光を発するカルセインの存在下での細胞のインキュベーション後に蛍光測定によ

50

て細胞の生存を評価した。

【0109】

5% CO₂下、37℃で、湿気を飽和させた培養の3日後に、最初に播種された運動ニューロンの最高50%が神経栄養因子で補充された培地で生存したが、一方、運動ニューロンの15%未満は、神経栄養因子を加えなかった培養培地で生存した。

【0110】

神経栄養因子を加えた培地中で運動ニューロンの生存と比べて、試験する化合物をNeurobasal培地(GIBCO)に加えたときの、化合物の神経保護活性を、運動ニューロンの死を抑制するその能力によって評価した。

【0111】

本発明に従う式Iの化合物は、Neurobasal培地中で運動ニューロンのより高い生存率を与えることができる濃度で神経保護活性を示した。この生存率は、神経栄養因子によって誘導される生存と比べた、試験化合物による処理後の生細胞の数によって表される。この比が0より大きい場合には、化合物の効果は、運動ニューロンの生存に対して陽性である。

【0112】

得られた結果は以下のとおりである。

【0113】

【表3】

下記実施例の化合物	濃度 (μM)	比
3	3	0.60
7	1	0.46
9	0.6	0.25
10	1	0.25
13	1	0.34

【0114】

脊髄運動ニューロンのその栄養効果によって、本発明に従う式Iの化合物は、特に筋萎縮症の治療、特に、筋萎縮性側索硬化症又は小児脊髄筋萎縮症の治療、及び脊髄損傷の治療における医薬として有用であることが明らかになった。

【0115】

実施例16：ハンチンチンの成熟形態の過発現によって起こる死に対する線条体ニューロンの保護に対する、式Iの化合物の効果

線条体ニューロンの一次培養物は調製され、文献(Primary striatal neuronal culture, Mao L. et al., Methods Mol. Med., 2003, 79: 379-86)に記載されている。細胞をRaoul et al., (ALS-結合SOD1突然変異によるFas増強作用の下流の特定の経路によって誘導される運動ニューロン死, Neuron, 2002, 35: 1067-83)の方法に従ってエレクトロポレーションし、その後に、プロモーター要素を含む発現ベクター又はプラスミドで縫い付け(sowing)、次いで最初の480アミノ酸及び68個のCAGを含むハンチンチンの切断形態をコードするDNAで縫い付けた(Saudou et al., ハンチンチンは、アポトーシスを誘導するたえに核内で働くが、死は核内封入体の形成とは関連しない, Cell, 1998, 95: 55-56)。緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするDNAを含む第2の発現ベクターもエレクトロポレーションし、レポーター遺伝子として使用される。ハンチンチンをコードするプラスミドのDNAを塩化セシウムで精製することによって調製した。DNA配列を含むプラスミドをQiagenカラムで調製した。DNA配列の完全性をシーケンシング、トランスフェクション及びウエスタンブロッティングにより確認した。エレクトロポレーションで生き残る細胞を、96-ウェルプレートの1ウェル当たり、4,000細胞の密度で播種した。培養は、ピルビン

酸塩及びB-27 (Beckton Dickinson) で補充したNeurobasal培地 (GIBCO) 中で行った。培地を変えることなく、細胞を7日間培養中で維持した。

【0116】

試験化合物による処理は、0.5%ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で1 μ Mの最終濃度で播種したすぐ後に行った。陽性対照は、5 ng/mlの最終濃度でBDNFを加えることにより作製した。陰性対照は、0.5% DMSOであった。

【0117】

細胞死を、GFPを発現する生細胞数をカウントすることにより7日後に評価した。

【0118】

試験化合物の活性を、BDNF (脳由来神経栄養因子) で補充した培地中での線条体ニューロンの生存と比べた、Neurobasal培地中で培養した線条体ニューロンの死を抑制する化合物の能力によって、評価した。

【0119】

得られた結果は以下のとおりである。

【0120】

【表4】

下記実施例の化合物	濃度 (μ M)	比
3	1	0.3
9	0.3	0.5

【0121】

10⁻⁶ Mの濃度では、試験化合物は、BDNF-処理細胞と比べて、突然変異型ハンチンチンによって誘導される細胞死に対して最大60%の保護効果を示した。

【0122】

その神経保護効果によって、本発明に従う式Iの化合物は、神経変性疾患の治療又は予防、特に筋萎縮症の治療、筋萎縮性側索硬化症の治療、脊髄及び末梢神経の損傷の治療、及びハンチントン病の治療を目的とした医薬として有用であることが明らかになった。

【0123】

実施例17：皮質ニューロンの保護に対する式Iの化合物の効果

皮質ニューロンをE18妊娠段階のスプラグドローラット胚から調製し、2% B27 (Invitrogen) 及び2%ピルビン酸ナトリウムで補充したNeurobasal培地 (Invitrogen) で333細胞/mm²の密度で、96-ウェルプレートで培養した。これらの培養条件下、培養物中、非常に高い皮質ニューロン純度を得ることができた。培養6日後に、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した10 μ Mのカンプトテシンを加えることによって、皮質ニューロンの死を誘導した。同時に、ニューロンを試験化合物の様々な濃度で処理した。処理後の最終DMSO濃度は、1%であった。カンプトテシンによるインキュベーションの16時間後に、生存細胞をカウントすることによってニューロンの生存を評価した。そのために、細胞を活性色素 (vital dye)、カルセイン-AM (Invitrogen) 2 μ g/mlの存在下に、20分間インキュベートした。標識後、ウェル全体のデジタル画像 (露光時間40ミリ秒) が得られる画像分析ソフトウェアパッケージTINA 4.5 (TROPHOS, FRANCE) を用いる画像ステーション (Flash Cytometer, TROPHOS, FRANCE) の方法により、各培養ウェルを分析した。次いで、ピクセルサイズ基準 (最小=10; 最大=40) によって定義される細胞は、TINA 4.5ソフトウェアパッケージ (TROPHOS) の方法によりカウントした。

【0124】

得られた結果は以下のとおりである。

カンプトテシンは、細胞生存の減少を誘導した。試験化合物による細胞のインキュベーションは、数百nMのオーダーのEC50で用量依存的に細胞生存を増加させた。

【 0 1 2 5 】

【 表 5 】

	対照	化合物 3			
		0	0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M
細胞生存性	100 \pm	43.2 \pm	63.3 \pm	99.1 \pm	112.2 \pm
(%)	18.4	17.4	20.3	15.7	22.3

平均 \pm 標準偏差, n=8 ウェル

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	25/08 (2006.01)	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	19/04 (2006.01)	A 6 1 P	19/04
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
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	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	39/02 (2006.01)	A 6 1 P	39/02
A 6 1 P	31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00
A 6 1 P	1/02 (2006.01)	A 6 1 P	1/02
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16
C 0 7 J	41/00 (2006.01)	C 0 7 J	41/00 C S P

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ドルオー, シリル

フランス国, 8 3 3 0 0 ドラギニャン, クロ ジャン エカール 3 9 2

(72)発明者 モー, デルフィーヌ

フランス国, エフ - 0 6 1 3 0 グラス, ルート ドゥ サン マチュー 3 1, レジダンス
レ カスカードゥ, パティマン ニアガーラ, アパルトマン ベ 1 1

審査官 井上 典之

(56)参考文献 中国特許出願公開第 1 4 5 0 0 8 0 (C N , A)

国際公開第 2 0 0 4 / 0 8 2 5 8 1 (W O , A 1)

特開平 0 6 - 1 7 2 3 7 8 (J P , A)

特表 2 0 0 6 - 5 1 9 8 1 9 (J P , A)

OKA, K., ET AL., "Regiospecific Beckmann Rearrangement of 3-Oxo-4-ene Steroid Oximes"
, JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, 1 9 7 8 年, VOL.43, NO.19, PP.3790-3791

J. Org. Chem., 1 9 7 8 年, vol.43, p.3790-3791

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 J

A 6 1 K 3 1 /

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)