

## 明 細 書

### プテリン誘導体含有活性酸素消去剤

#### 技術分野

本発明は、プテリン誘導体を含有する活性酸素消去剤に関する。また、本発明は、前記のプテリン誘導体を含有する医薬組成物又は化粧品組成物に関する。

#### 背景技術

従来から、活性酸素が関与すると考えられている疾病が数多く知られている。こうした疾病の例としては、虚血障害（例えば、虚血性心疾患後遺症、脳梗塞後遺症、又はストレス潰瘍）、再カン流障害、炎症性疾患（例えば、慢性リュウマチ、腎炎、又は喘息）、癌、糖尿病、白内障、動脈硬化、薬物中毒、農薬中毒、薬物の過剰量投与による肝障害、農薬の過剰量摂取による肝障害、未熟児網膜症、光線過敏症、又は放射線障害などがある。

このような疾病の治療には、活性酸素消去作用を有する酵素、例えば、スーパーオキシドジスムターゼ（以下、SODと称することがある）の投与が有効とされている。しかし、SODは生体内半減期が極めて短いので、大量に投与することが必要である。また、酵素はタンパク質であるために、抗原性を有し、長期投与が必要な場合には抗原抗体反応によるアナフィラキシーショックなどの副作用を考慮する必要がある。更に、経口投与では効果が得られない等の種々の問題があった。

活性酸素に対して消去作用を有する非タンパク質化合物としては、プテリン誘導体が知られている。例えば、特開平6-56669号公報には、プテリン誘導体又はネオプテリン誘導体が活性酸素消去作用を有することが記載されている。また、特開平7-188232号公報には、前記と同様のプテリン誘導体又はネオプテリン誘導体が、フリーラジカルによる細胞障害に有効であることが記載されている。

前記のプテリン誘導体又はネオプテリン誘導体の代表的化合物であるネオプテ

リン〔すなわち、2-アミノ-4-オキソ-6-(D-エリスロ-1', 2', 3'-トリヒドロキシプロピル)-プテリジン：略称はNP〕は、マクロファージによって産生される物質であり、その生理的役割は現在のところ未だよく分かっていないが、活性酸素に対して抗酸化作用を有することは知られている〔例えば、S. Kojima等, FEBS, 304, 2, 3, 163-166, 1992; S. Kojima等, FEBS, 329, 1, 2, 125-128, 1993〕。

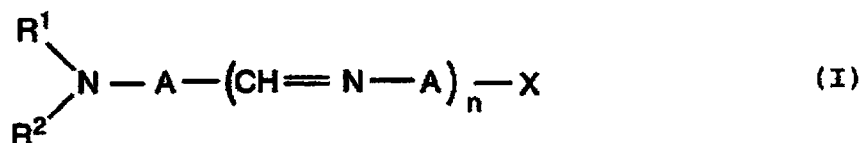
また、還元型ネオブテリンに相当する5, 6, 7, 8-テトラヒドロネオブテリン〔略称はNPH4〕が、強力な抗酸化作用を有することも知られており、各種の疾患に有効であることが報告されている〔例えば、S. Kojima等, FEBS, 304, 2, 3, 163-166, 1992; Ichio等, Biochemical Pharmacology, 45, 10, 1953-1958, 1993; Arai等, Neuroscience Letters, 173 (1994) 107-110〕。

しかしながら、前記の5, 6, 7, 8-テトラヒドロネオブテリン〔NPH4〕には催奇形性があるので、活性酸素消去作用を有する別異の非タンパク質化合物が求められていた。

本発明者は、活性酸素消去作用を有する非タンパク質化合物を鋭意探求した結果、従来、活性酸素消去作用を有することが全く知られていなかったプテリン誘導体が活性酸素消去作用を示すことを見出した。本発明は、こうした知見に基づくものである。

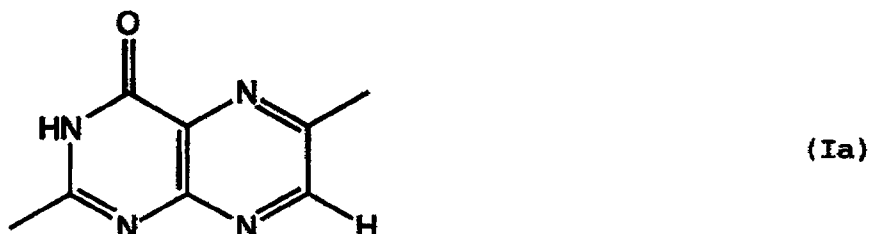
## 発明の開示

前記の目的は、本発明による、式(I)：



〔式中、R<sup>1</sup> 及びR<sup>2</sup> は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～4のアルキル

基、又は式  $R^3 - CO -$  ( $R^3$  は炭素数 1～4 のアルキル基である) で表されるアシル基であり、X は、ホルミル基又はヒドロキシメチル基であり、A は式 (I a) :



で表される基であり、n は 0 又は 1 以上の整数であるが、但し、X がヒドロキシメチル基である場合には n は 0 であるものとし、そして n が 1 以上の整数である場合には、 $R^1$  及び  $R^2$  はそれぞれ水素原子であり、X はホルミル基であるものとする] で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする、活性酸素消去剤によって達成することができる。

また、本発明は、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又は薬剤学的に許容することのできるその塩を有効成分として含有することを特徴とする、医薬組成物にも関する。

更にまた、本発明は、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、化粧品組成物にも関する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、PMN-PMA 系における 6-ホルミルプテリンの活性酸素消去活性を活性酸素の積算発光量によって示すグラフである。

図 2 は、DMSO 中の超酸化カリウム溶液に 6-ホルミルプテリンを加えた場合の低温電子スピン共鳴法で測定した結果を示すグラフである。

図 3 は、血流遮断を行っていない完全に正常な砂ネズミの脳海馬領域組織切片の顕微鏡写真である。

図 4 は、砂ネズミ一過性脳虚血モデルの対照群の脳海馬領域組織切片の顕微鏡写真である。

図5は、砂ネズミ一過性脳虚血モデルの6-ホルミループテリン投与群の脳海馬領域組織切片の顕微鏡写真である。

発明を実施するための最良の形態

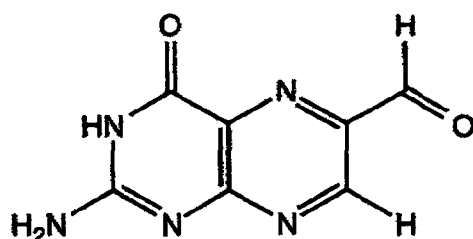
以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の活性酸素消去剤は、有効成分として前記式(I)で表されるプテリン誘導体を含有する。

$R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$ で表される炭素数1～4のアルキル基とは、直鎖又は分枝鎖の炭素数1～4のアルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*sec*-ブチル基、又は*tert*-ブチル基であり、メチル基又はエチル基が好ましい。前記式(I)で表される化合物において、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して、同一又は異なる、水素原子、前記の炭素数1～4のアルキル基、又は式 $R^3-CO-$ ( $R^3$ は前記の炭素数1～4のアルキル基である)で表されるアシル基であることができる。前記式(I)において、*n*は、0又は1以上の整数、好ましくは0又は1～100の整数、より好ましくは0又は1～10の整数である。

前記式(I)で表されるプテリン誘導体としては、 $R^1$ 及び $R^2$ が、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～4のアルキル基、又は式 $R^3-CO-$ で表されるアシル基であり、 $R^3$ が炭素数1～4のアルキル基であり、Aが式(Ia)で表される基であり、*n*が0又は1以上の整数であり、Xがホルミル基である6-ホルミループテリン誘導体为好ましい。

更に、前記式(I)で表されるプテリン誘導体としては、 $R^1$ 及び $R^2$ が水素原子であり、そして*n*が0である前記式(I)で表される化合物、すなわち、式(II)：



(II)

で表される 6-ホルミループテリンがより好ましい。

6-ホルミループテリンは、アミノ基及びホルミル基を有するので、水溶液中で複数の分子間でシッフ塩基を自然に形成し、6-ホルミループテリンのオリゴマー又はポリマーとなることができる。このオリゴマー又はポリマーには、直鎖状のオリゴマー又はポリマーだけでなく、環状のオリゴマー又はポリマーも含まれる。単量体からオリゴマー又はポリマーへの反応は可逆反応であり、アルカリ条件下では、6-ホルミループテリンオリゴマー又はポリマーは、単量体である 6-ホルミループテリンに容易に分解する。従って、生体内や皮膚上でも同様の可逆反応が行われるものと思われる。前記 6-ホルミループテリンオリゴマー又はポリマーは、 $R^1$  及び  $R^2$  が同時に水素原子であり、そして  $n$  が 1 以上（好ましくは 1～100）の整数である前記式（I）で表される化合物であり、本発明の活性酸素消去剤における有効成分として使用することができる。

生体内で、前記式（I）で表されるプテリン誘導体に容易に変換することのできる誘導体、すなわち、プロドラッグも本発明の有効成分として使用することができる。適当なプロドラッグの選択及び製造に一般的に用いられる方法は、例えば、Design of Prodrugs, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985に記載されている。

6-ホルミループテリンは、遊離化合物の形で有効成分として使用できると共に、その塩、特に薬剤学的に許容することのできるその塩、例えば、無機酸塩（例えば、塩酸塩若しくは硫酸塩）又は有機酸塩（例えば、カンファースルホン酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、若しくはシュウ酸塩など）の形で使用することもできる。また、前記の 6-ホルミループテリンオリゴマー又はポリマーの形で使用することもできる。6-ホルミループテリンオリゴマー又はポリマーは、公知化合物であり、それ自体公知の方法によって、遊離化合物をその塩へ、あるいはその塩を遊離化合物又は別の塩に変換することができる。

前記式（I）で表されるプテリン誘導体も、遊離化合物の形で有効成分として使用できると共に、その塩、特に薬剤学的に許容することのできるその塩、例えば、無機酸塩（例えば、塩酸塩若しくは硫酸塩）又は有機酸塩（例えば、カンファースルホン酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、若しくはシュウ酸塩など）

の形で使用することもできる。前記式 (I) で表されるプテリン誘導体は、公知化合物であり、それ自体公知の方法で調製することができる。また、それ自体公知の方法によって、遊離化合物をその塩へ、あるいはその塩を遊離化合物又は別の塩に変換することができる。

前記式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその薬剤学的に許容することのできる塩は、活性酸素消去作用を有するかあるいは活性酸素消去作用を有する化合物を誘導することができるので、本発明による医薬組成物の有効成分として用いることができる。

すなわち、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体の内、 $n$  が 0 であり、そして  $R^1$  又は  $R^2$  のいずれかが水素原子でない式 (I) で表されるプテリン誘導体、又は 6-ホルミループテリン〔すなわち、 $n$  が 0 であり、そして  $R^1$  及び  $R^2$  が同時に水素原子で有り、 $X$  がホルミル基である式 (I) で表される化合物〕は、それ自体が、活性酸素を消去する作用を有するので、活性酸素生成系の種類を問わず、種々の原因で発生する活性酸素に対して広く有効である。

また、前記式 (I) で表されるプテリン誘導体の内、 $n$  が 1 以上の整数、特に  $n$  が 1 ~ 100 の整数である式 (I) で表されるプテリン誘導体は、投与した動物の体内又は体表で徐々に分解し、6-ホルミループテリンを放出するので、活性酸素生成系の種類を問わず、種々の原因で発生する活性酸素に対して広く有効である。

従って、本発明の医薬組成物は、活性酸素やラジカルが関与する種々の疾病、例えば、虚血障害（例えば、虚血性心疾患後遺症、脳梗塞後遺症、又はストレス潰瘍）、再カン流障害、炎症性疾患（例えば、慢性リュウマチ、腎炎、又は喘息）、癌、糖尿病、白内障、動脈硬化、薬物中毒、農薬中毒、薬物の過剰量投与による肝障害、農薬の過剰量摂取による肝障害、未熟児網膜症、光線過敏症、又は放射線障害などを効果的に治療又は予防することができる。

本発明による医薬組成物は、プテリン誘導体又は薬剤学的に許容することのできるその塩を、それ単独で、又は好ましくは薬剤学的若しくは獣医学的に許容することのできる通常の担体と共に、動物、好ましくは哺乳動物（特には、ヒト）に投与することができる。

投与剤型としては、特に限定はなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、若しくは丸剤などの経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、ゼリー、ジェル、ペースト、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。

これらの経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。例えば、6-ホルミルブテリンと乳糖とを混合して充填したカプセル剤などである。

非経口投与方法としては、クリーム又は軟膏等による局所投与、注射（皮下、静脈内等）、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。

例えば、注射剤の調製においては、有効成分としてのブテリン誘導体の他に、例えば、生理食塩水若しくはリンゲル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤等を任意に用いることができる。

また、本発明の医薬組成物は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明の医薬組成物をエチレンビニル酢酸ポリマーのペレットに取り込ませて、このペレットを治療すべき組織中に外科的に移植することができる。

本発明の医薬組成物は、これに限定されるものではないが、ブテリン誘導体又は薬剤学的に許容することのできるその塩を、0.01～99重量%、好ましくは0.1～80重量%の量で含有することができる。

本発明の医薬組成物を、その活性酸素消去作用を利用して用いる場合の投与量

は、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、又は投与方法などにより異なり、特に制限はないが、通常成人で6-ホルミループテリン量として0.1~100mg/kg体重を、1日1~4回程度にわけて経口的に又は非経口的に投与することができる。

前記式(I)で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその薬剤学的に許容することのできる塩は、活性酸素消去作用を有するかあるいは活性酸素消去作用を有する化合物を誘導することができるので、本発明による化粧品組成物の有効成分として用いることができる。皮膚は、生体の最外層にあるため、環境要因(特に、紫外線的作用)による活性酸素の影響を受ける。活性酸素の影響による皮膚疾患としては、例えば、炎症性皮膚疾患、膠原病、角化症、水疱症、又は光線過敏症を挙げることができる。皮膚の角質にはバリア機能があるので、化粧品などの外用剤の形で投与すると、有効成分が主に表皮でのみ作用し、例えば、表皮における脂質過酸化反応の抑制にかなり有用であることも知られている。従って、本発明の化粧品組成物は、紫外線的作用をはじめ、放射線、二酸化窒素又はタバコ煙などの関与により皮膚表面に発生することのある活性酸素を消去することにより、活性酸素による皮膚損傷を回避若しくは軽減、あるいは予防することができる。

本発明による化粧品組成物において、前記式(I)で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩の配合率は、特に限定されないが、0.01~99重量%、好ましくは0.1~80重量%の量で含有することができる。

本発明の化粧品組成物には、一般的に化粧品に使用される他の成分、例えば、油分、酸化防止剤、界面活性剤、保湿剤、香料、水、アルコール、増粘剤、防腐剤、防黴剤、色剤、粉末、及び/又は薬剤等を適宜配合することができる。また、これらとは別に、必要に応じて当業者に周知の紫外線吸収剤、例えば、安息香酸系紫外線吸収剤(例えば、パラアミノ安息香酸)、アントラニル酸系紫外線吸収剤(例えば、ホモメチルーN-アセチルアントラニレート)、サリチル酸系紫外線吸収剤(例えば、アミルサリシレート)、桂皮酸系紫外線吸収剤(例えば、オクチルシンナメート)、及び/又はベンゾフェノン系紫外線吸収剤(例えば、2,4-ジヒドロキシベンゾフェノン)等を配合することもできる。

本発明の化粧品組成物は、溶液、乳化液、練り状混合物、固形物（プレス品）、粉末等任意の形態をとることが可能であり、日焼け化粧品、日焼け止め化粧品、化粧下地、パック、化粧水、ファンデーション、クリーム、乳液、シャンプー、リンス、頭髮化粧品等として利用することができる。前記のように、活性酸素は強紫外線存在下で過剰に発生することがあるために、強紫外線存在下で使用する日焼け化粧品又は日焼け止め化粧品、例えば、サンオイル、サンローション、サンスクリーン、日焼け止めクリーム、日焼け止めローション、日焼け止め用ファンデーション、日焼け止め用化粧下地、又は日焼け止め用ヘアートニック等に行うことが好ましい。

6-ホルミループテリンについて、ラットを用いる急性毒性試験を行ったところ、静脈内注射により6 mg/kg体重量の6-ホルミループテリンを10匹のラットに投与し、3か月間観察したが、死亡例は認められなかった。

本発明による活性酸素消去剤の用途も医薬品や化粧品に限定されるものではなく、種々の用途、例えば、機能性食品や健康食品として飲食物の形で与えることも可能であり、更に飼料として非ヒト動物（特に飼育動物）に与えることができ、また臓器移植用の臓器を保存するための保存液中に添加剤として用いることもできる。

## 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

### 実施例1：6-ホルミループテリンの活性酸素消去活性の測定（PMN-PMA系）

健康成人より静脈血10mlを採血し、分離採取した好中球（polymorphonuclear leukocyte；略称はPMN）を約 $1 \times 10^6$ 細胞/mlになるようにHBSS（Hanks' balanced salt solution）に懸濁した。化学発光物質（すなわち、活性酸素の存在により化学発光を生じる化合物）である2-メチル-6-フェニル-3,7-ジヒドロイミダゾー（1,2- $\alpha$ ）-ピラジン-3-オン（以下、CLAと称する）を5

0  $\mu$ Mになるようにリン酸バッファー溶液（以下、PBSと称する）に溶解した。好中球を刺激することによって活性酸素を発生させる、いわゆる好中球刺激剤であるホルボルミリステートアセテート（phorbol myristate acetate；略称はPMA）を20  $\mu$ g/mlになるようにPBSに溶解した。こうして調製した好中球懸濁液、CLA溶液、及びPMA溶液は、測定に使用するまで氷冷保存した。

本発明の活性酸素消去剤の有効成分である6-ホルミループテリンを100  $\mu$ M、250  $\mu$ M、又は500  $\mu$ MになるようにPBSに溶解し、測定に使用する前に37℃に加温した。併せて、コントロールとして使用するPBSも測定に使用する前に37℃に加温した。

測定は、以下の手順で実施した。好中球懸濁液2 mlから遠心抽出した好中球に、各種濃度の6-ホルミループテリン溶液、又はPBSを加えて総容量を1930  $\mu$ lに調整し、試験管に入れて37℃で15分間加温した。CLA溶液50  $\mu$ lを添加した後、化学発光測定器にセットし、化学発光量の測定を開始した。測定開始から1分後に、PMA溶液20  $\mu$ lを注射器で試験管に注入した。測定は、温度37℃で10秒ごとに実施し、約10分間続けた。

結果を、図1に示す。図1のグラフは、10秒ごとの発光量を次々に積算した合計発光量を示す。曲線aは、コントロール、すなわち、6-ホルミループテリンの代わりにPBSのみを添加した場合の測定結果を示し、曲線bは、100  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合の測定結果を示し、曲線cは、250  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合の測定結果を示し、曲線dは、500  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合の測定結果を示す。6-ホルミループテリンの代わりにPBSのみを添加したコントロール（曲線a）に比べ、100  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合（曲線b）では、化学発光量、すなわち活性酸素量が大きく抑制され、更に、250  $\mu$ M又は500  $\mu$ M 6-ホルミループテリンを添加した場合（曲線c又は曲線d）では、化学発光量、すなわち活性酸素量がほぼ消失した。

実施例2：6-ホルミループテリンの活性酸素消去活性の測定（超酸化カリウム由来）

ジメチルスルホキシド (DMSO) 20 ml 中に超酸化カリウム ( $\text{KO}_2$ ) 28 mg を添加して飽和溶液を調製し、DMSO 中で活性酸素を発生させた。ここで、標準物質として 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-N-オキシド (TEMPO) を使用し、これを DMSO に加え、0.1、0.3、0.5、0.7、1、1.2、又は 1.5 mM 溶液として用いた。得られた電子スピン共鳴シグナル (77 K で測定) を積分し、検量線を作成した。この検量線により、DMSO 中の活性酸素の濃度を測定したところ、約 0.5 mM であった。

本発明の活性酸素消去剤の有効成分である 6-ホルミループテリンを 10 mM になるように DMSO に溶解した。前記の  $\text{KO}_2$  溶液に 6-ホルミループテリンを加えない場合の活性酸素発生量 (コントロール)、及び前記の  $\text{KO}_2$  溶液に所定濃度の 6-ホルミループテリンを加えた場合の活性酸素発生量を、低温 (77 K) 電子スピン共鳴法により測定した。

測定結果を図 2 に示す。6-ホルミループテリンの DMSO 中の最終濃度を 0.001 mM から 1 mM まで 10 倍ずつ上げていった場合の  $\text{KO}_2$  からの活性酸素発生量は、矢印 A で示す位置、すなわち、328 mT の位置に表れるピーク (微分型) を 2 回積分して求めた値の大きさから求めることができる。曲線 a はコントロール、すなわち、6-ホルミループテリンを加えない場合の測定結果を示し、曲線 b ~ e は、0.001 mM、0.01 mM、0.1 mM、及び 1 mM 6-ホルミループテリンを添加した場合のそれぞれの測定結果を示す。

$\text{KO}_2$  溶液に 6-ホルミループテリンを加えない場合に比べて、 $\text{KO}_2$  溶液に 6-ホルミループテリンを加えた場合には、6-ホルミループテリン濃度が 0.1 mM になると、 $\text{KO}_2$  からの活性酸素発生量が低下し、6-ホルミループテリン濃度が 1 mM になると、 $\text{KO}_2$  からの活性酸素発生量がほぼ消失した。

先に確認したように、DMSO 20 ml に  $\text{KO}_2$  28 mg を加えた系から発生する活性酸素量は、約 0.5 mM であることから、6-ホルミループテリンが、 $\text{KO}_2$  から発生する活性酸素を約 1 : 1 の割合で消去したと考えられる。

#### 実施例 3 : ヒドロキシメチル体の活性酸素消去活性の測定 (超酸化カリウム由来)

0.001 mM ~ 1 mM の 6-ホルミループテリンに替えて、0.01 mM ~ 10 mM の 6-ヒドロキシメチループテリン [前記式 (I) において、 $\text{R}^1$  及び

R<sup>2</sup> が水素原子であり、Xがヒドロキシメチル基であり、nが0である化合物〕を使用すること以外は、前記実施例2に記載の操作を繰り返すことによって、6-ヒドロキシメチループテリンの活性酸素消去活性を測定したところ、6-ホルミループテリンと同様の活性酸素消去活性が、6-ホルミループテリンの10倍濃度の6-ヒドロキシメチループテリンにおいて観察された。

#### 実施例4：活性酸素消去作用による遅発性神経細胞死の抑制

全身麻酔した砂ネズミ（体重＝約80g）の頸部を切開し、直視下で両側頸動脈をクリップで結紮することにより血流を遮断した。5分後に血流を再開させ、創部を縫合した。血流の再開から30分経過後に、対照群には生理食塩水1mlを腹腔内投与し、薬物投与群には50mM6-ホルミループテリン（生理食塩水内）1mlを腹腔内投与し、その後麻酔から覚まして、1週間飼育した。1週間後、前記の砂ネズミを全身麻酔して脳を摘出し、組織切片を作成し、神経細胞を特異的に描出する微小管結合タンパク質2(microtubule-associated protein 2; MAP2)染色を施すことにより、脳海馬領域の遅発性神経細胞死(delayed neuronal death; DND)の程度を評価した。

図3～図5に前記砂ネズミの脳海馬領域の組織切片の顕微鏡写真を示す。図3は血流遮断を行っていない完全に正常な組織状態の組織切片写真であり、図4は対照群の組織切片写真であり、そして図5は6-ホルミループテリン投与群の組織切片写真である。また、図3(1)、図4(1)及び図5(1)は、それぞれ約60倍の拡大写真であり、図3(2)、図4(2)及び図5(2)は、それぞれ約600倍の拡大写真である。

図4では、神経細胞が完全に脱落した状態を示しており、図5では、多くの神経細胞が生存している状態を示している。

前記の結果は、6-ホルミループテリンはその活性酸素消去作用により、砂ネズミ一過性脳虚血モデルにおいて遅発性神経細胞死が抑制されることを示している。

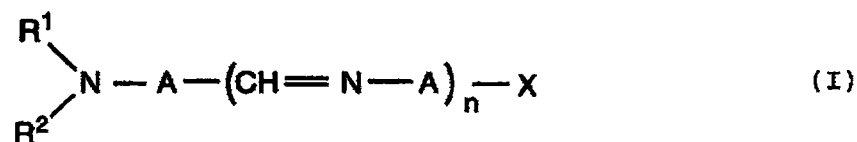
産業上の利用可能性

本発明の活性酸素消去剤は、種々の原因で発生する活性酸素に対して広く有効である。従って、前記の活性酸素消去剤を含有する本発明の医薬組成物は、活性酸素が関与するものと考えられる各種の疾病を効果的に治療することができるものと期待される。また、前記の活性酸素消去剤を含有する本発明の化粧品組成物は、紫外線などの作用によって発生する活性酸素による悪影響を軽減ないし回避することが期待される。



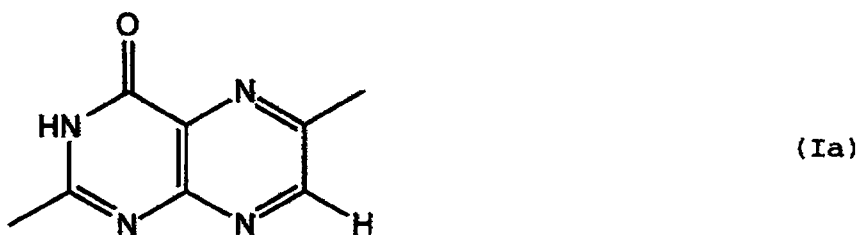
## 請 求 の 範 囲

## 1. 式 (I) :



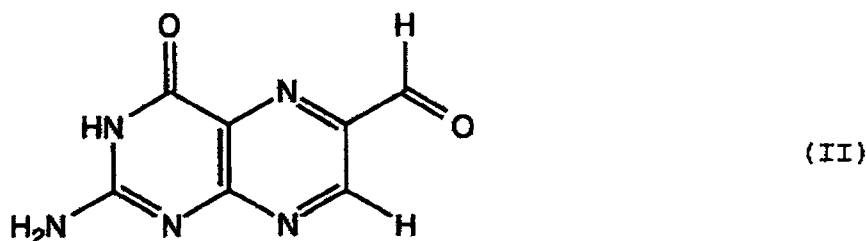
〔式中、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数 1～4 のアルキル基、又は式  $\text{R}^3 - \text{CO} -$  ( $\text{R}^3$  は炭素数 1～4 のアルキル基である) で表されるアシル基であり、 $\text{X}$  は、ホルミル基又はヒドロキシメチル基であり、 $\text{A}$  は式

(Ia) :



で表される基であり、 $n$  は 0 又は 1 以上の整数であるが、但し、 $\text{X}$  がヒドロキシメチル基である場合には  $n$  は 0 であるものとし、そして  $n$  が 1 以上の整数である場合には、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  はそれぞれ水素原子であり、 $\text{X}$  はホルミル基であるものとする〕で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする、活性酸素消去剤。

## 2. 式 (II) :



で表される 6-ホルミルプテリン又はその塩を有効成分として含有する、請求



項 1 に記載の活性酸素消去剤。

3. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又は薬剤学的に許容することのできるその塩を有効成分として含有することを特徴とする、医薬組成物。

4. 活性酸素が関与する疾病の予防又は治療用である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

5. 活性酸素が関与する疾病が、虚血障害、再カン流障害、炎症性疾患、癌、糖尿病、白内障、動脈硬化、薬物中毒、農薬中毒、薬物の過剰量投与による肝障害、農薬の過剰量摂取による肝障害、未熟児網膜症、光線過敏症、又は放射線障害である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

6. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、化粧品組成物。

7. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療用の機能性食品。

8. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療用の飼料。

9. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を含有することを特徴とする、臓器保存液用添加剤。

10. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療に有効な量で、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療が必要な対象に投与することを含む、活性酸素が関与する疾病の予防又は治療方法。

11. 請求項 1 に記載の式 (I) で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩の、医薬組成物製造への使用。

1 / 5

FIG. 1

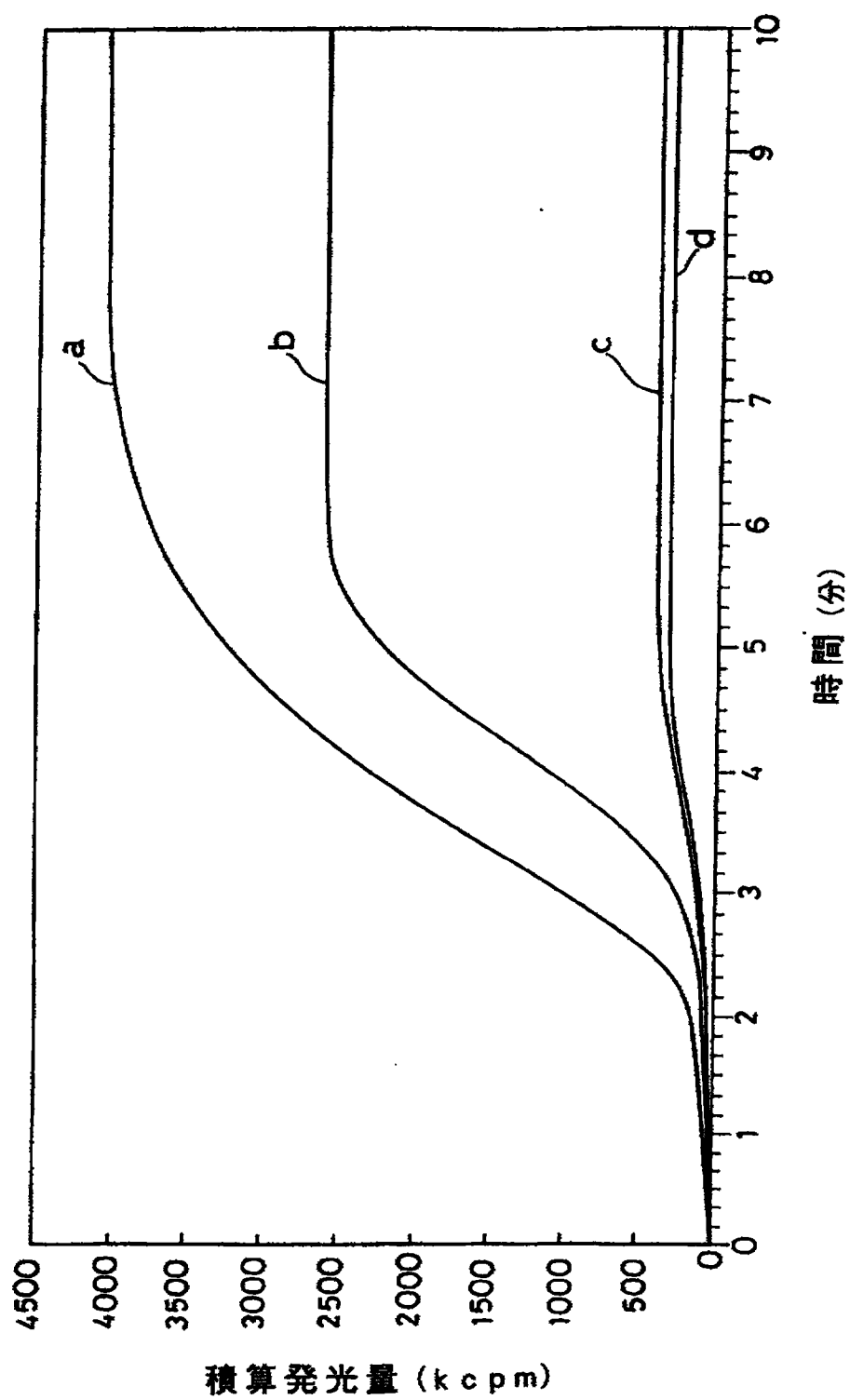
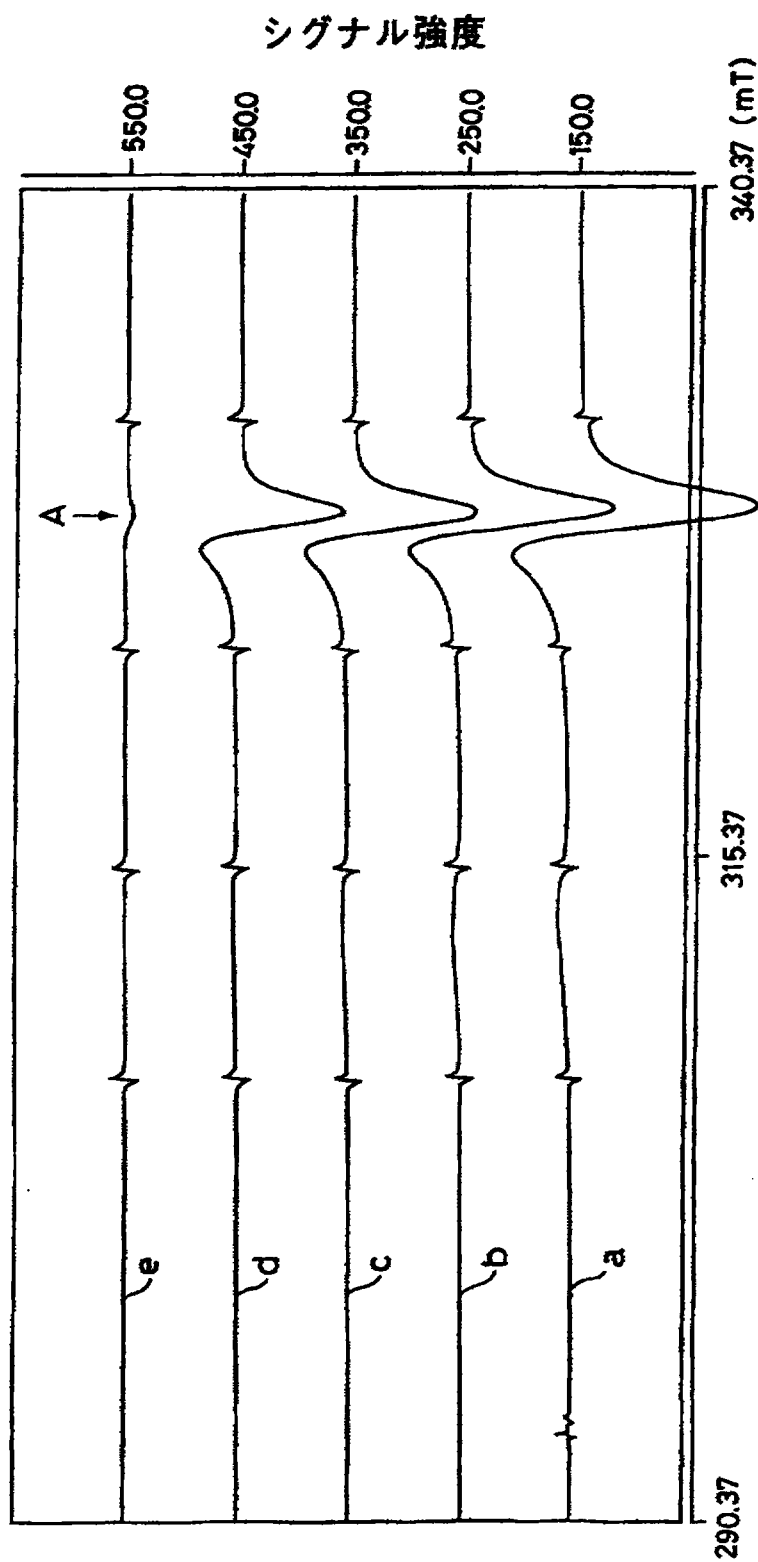


FIG. 2



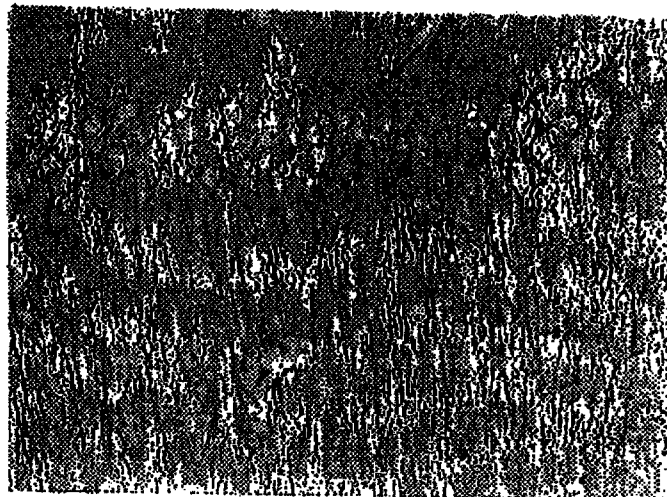
3 / 5

FIG. 3

(1)



(2)



4 / 5

FIG. 4

(1)



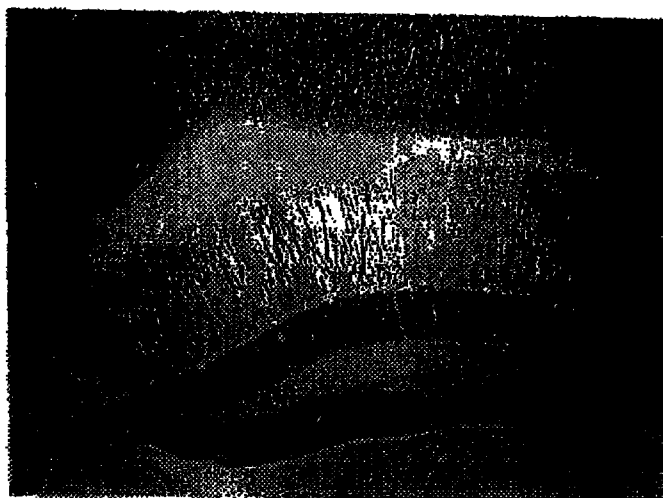
(2)



5 / 5

FIG. 5

(1)



(2)



## DESCRIPTION

### ACTIVE OXYGEN SCAVENGERS CONTAINING PTERIN DERIVATIVES

#### TECHNICAL FIELD

The present invention relates to an active oxygen scavenger containing a pterin derivative. Further, the present invention relates to a pharmaceutical or cosmetic composition containing the pterin derivative.

#### BACKGROUND ART

Various diseases which an active oxygen would be implicated in have been known from the past. Examples of such diseases are ischemic disorder (such as sequela of ischemic heart disease, sequela of cerebral infarction, or stress ulcers), reperfusion disorder, inflammatory disease (such as chronic rheumatism, nephritis, or asthma), cancer, diabetes, cataract, arteriosclerosis, drug toxinoses, pesticide toxinoses, hepatopathy caused by an excess administration of a drug or an excess taking up of a pesticide, retinopathy of prematurity, hyperesthesia optica, or disorder caused by radiation.

For the treatment of such diseases, administration of an enzyme exhibiting an active oxygen scavenging activity, for example, superoxide dismutase (hereinafter sometimes referred to as SOD) is considered effective. However, the half-life period of SOD in a living body is extremely short, and therefore, SOD should be administered in a large amount. When a long-term administration of SOD is required, it is necessary to take care of side effects, such as an anaphylactic shock caused by an antigen-antibody reaction, because the enzyme is a protein and has antigenicity. Further, there exist various problems, for example, in that no effect can be obtained from oral administration.

As one of non-protein compounds having the active oxygen scavenging activity, pterin derivatives are known. For example, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 6-56669 discloses that a pterin derivative or a neopterin derivative

exhibits the active oxygen scavenging activity. Further, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 7-188232 discloses that the above-mentioned pterin derivative or neopterin derivative is effective against cytopathy caused by free radicals.

Neopterin (abbreviated to NP), i.e., 2-amino-4-oxo-6-(D-erythro-1',2',3'-trihydroxypropyl)-pteridine, is a typical compound of the above-mentioned pterin derivatives or neopterin derivatives and released from macrophages. Although the physiological functions of NP are not completely elucidated, it is known to have an antioxidative activity against active oxygens (for example, S. Kojima et al., FEBS, 304, 2, 3, 163-166, 1992; or S. Kojima et al., FEBS, 329, 1, 2, 125-128, 1993).

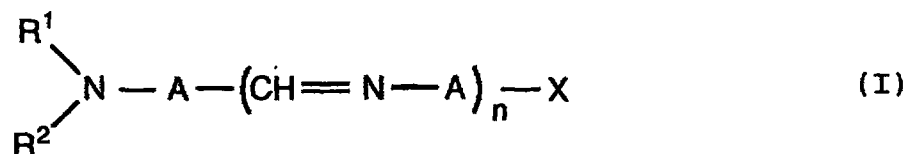
Further, it is known that 5,6,7,8-tetrahydroneopterin (abbreviated to NPH4), i.e., the reduced neopterin, has the potent antioxidative activity, and it is reported that NPH4 is effective against various diseases (for example, S. Kojima et al., FEBS, 304, 2, 3, 163-166, 1992; Ichio et al., Biochemical Pharmacology, 45, 10, 1953-1958, 1993; or Arai et al., Neuroscience Letters, 173, 107-110, 1994).

Nevertheless, 5,6,7,8-tetrahydroneopterin (NPH4) exhibits teratogenicity, and therefore, a different non-protein compound having the active oxygen scavenging activity has been desired.

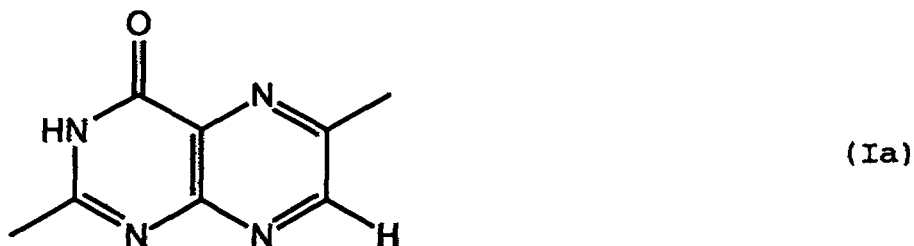
The inventors of the present invention engaged in intensive research to find non-protein compounds having the active oxygen scavenging activity, and as a result, found that a pterin derivative which has not been known to have the active oxygen scavenging activity actually exhibits such an activity. The present invention is based on the findings.

#### DISCLOSURE OF INVENTION

The object is achieved by the present invention relating to an active oxygen scavenger characterized by comprising as an active ingredient a pterin derivative of the formula (I):



wherein  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  are independently a hydrogen atom, an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, or an acyl group of the formula  $\text{R}^3\text{-CO-}$ ,  $\text{R}^3$  is an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms,  $\text{X}$  is a formyl or hydroxymethyl group,  $\text{A}$  is a group of the formula (Ia):



and  $n$  is 0 or an integer of 1 or more, with the proviso that when  $\text{X}$  is a hydroxymethyl group,  $n$  is 0, or when  $n$  is an integer of 1 or more, each of  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  is a hydrogen atom, and  $\text{X}$  is a formyl group, or a cyclic compound thereof, or a salt thereof.

Further, the present invention relates to a pharmaceutical composition characterized by comprising as an active ingredient the pterin derivative of the formula (I), or a cyclic compound thereof, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Furthermore, the present invention relates to a cosmetic composition characterized by comprising as an active ingredient the pterin derivative of the formula (I), or a cyclic compound thereof, or a salt thereof.

#### BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Figure 1 is a graph showing a cumulative amount of luminescence as the active oxygen scavenging activity of 6-formyl-pterin in PMN-PMA system.

Figure 2 is a graph showing the results of the measurement by the liquid He temperature election spin resonance spectroscopy, when 6-formyl-pterin was added to a DMSO solution of potassium superoxide.

Figure 3 is a photomicrograph of a slice of a cerebral hippocampus tissue from a completely normal gerbil which had not encountered hemostasis.

Figure 4 is a photomicrograph of a slice of a cerebral hippocampus tissue from the control group of gerbils which had suffered from transient cerebral ischemia.

Figure 5 is a photomicrograph of a slice of a cerebral hippocampus tissue from the 6-formyl-pterin-administering group of the transient cerebral ischemia model gerbils.

#### BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

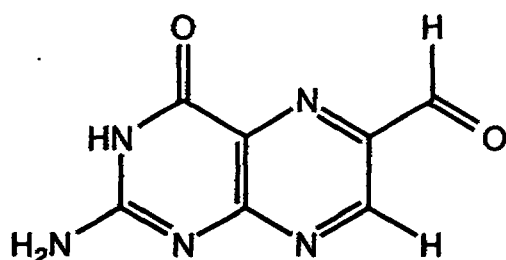
The present invention will be explained in detail hereinafter.

The active oxygen scavenger of the present invention contains the pterin derivative of the formula (I) as an active ingredient.

The alkyl group of 1 to 4 carbon atoms for  $R^1$ ,  $R^2$ , and  $R^3$  means a straight or branched alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, for example, a methyl, ethyl, n-propyl, i-propyl, n-butyl, i-butyl, sec-butyl, or tert-butyl group. A preferable group is a methyl or ethyl group. In the compound of the formula (I),  $R^1$  and  $R^2$ , which may be same or different, are independently a hydrogen atom, an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, or an acyl group of the formula  $R^3$ -CO-, wherein  $R^3$  is an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms. In the formula (I), n is 0 or an integer of 1 or more, preferably 0 or an integer of 1 to 100, more preferably 0 or an integer of 1 to 10.

A preferable pterin derivative is a 6-formyl-pterin derivative of the formula (I) wherein  $R^1$  and  $R^2$  are independently a hydrogen atom, an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, or an acyl group of the formula  $R^3$ -CO-,  $R^3$  is an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, A is a group of the formula (Ia), n is 0 or an integer of 1 or more, and X is a formyl group.

A more preferable pterin derivative is the compound of the formula (I) wherein  $R^1$  and  $R^2$  are hydrogen atoms, and n is 0, i.e., 6-formyl-pterin of the formula (II):



(II)

Because 6-formyl-pterin has an amino group and a formyl group, plural molecules thereof spontaneously produce Schiff bases in an aqueous solution to form 6-formyl-pterin oligomers or polymers. The oligomer or polymer may be not only a straight oligomer or polymer, but also a cyclic oligomer or polymer. The reaction from the monomers to the oligomer or polymer is reversible. Under alkaline conditions, the 6-formyl-pterin oligomer or polymer is easily cleaved to form the 6-formyl-pterin monomers. Therefore, the same reversible reaction will occur in a living body or on the surface of skin. The 6-formyl-pterin oligomer or polymer is a compound of the formula (I) wherein  $R^1$  and  $R^2$  are hydrogen atoms at the same time, and  $n$  is an integer of 1 or more, preferably 1 to 100, and may be used as the active ingredient in the active oxygen scavenger of the present invention.

A derivative which may be easily converted to the pterin derivative of the formula (I), i.e., a prodrug, may be used as the active ingredient of the invention. A method generally used for selecting and preparing an appropriate prodrug is disclosed in, for example, Design of Prodrugs, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

6-Formyl-pterin may be used as the active ingredient in the form of a free compound, or a salt thereof, particularly a pharmaceutically acceptable salt thereof, for example, a salt of an inorganic acid, such as hydrochloride or sulfate, or a salt of an organic acid, such as camphor sulfonate, tartarate, malate, or oxalate. Further, 6-formyl-pterin may be used in the form of the oligomer or polymer. The 6-formyl-pterin oligomer or polymer is a known compound and may be converted from a free compound to a salt thereof, from a salt to a free compound, or

from a salt to a different salt, in accordance with methods which are in themselves known.

The pterin derivative of the formula (I) may be also used as the active ingredient in the form of a free compound, or a salt thereof, particularly a pharmaceutically acceptable salt thereof, for example, a salt of an inorganic acid, such as hydrochloride or sulfate, or a salt of an organic acid, such as camphor sulfonate, tartarate, malate, or oxalate. The pterin derivative of the formula (I) is a known compound and may be prepared in accordance with methods which are in themselves known. The pterin derivative of the formula (I) may be converted from a free compound to a salt thereof, from a salt to a free compound, or from a salt to a different salt, in accordance with methods which are in themselves known.

The pterin derivative of the formula (I), or the cyclic compound thereof, or the pharmaceutically acceptable salt thereof exhibits the active oxygen scavenging activity or may be converted to a compound exhibiting the active oxygen scavenging activity, and therefore, it may be used as the active ingredient of the pharmaceutical composition of the present invention.

The pterin derivative of the formula (I) wherein  $n$  is 0 and one of  $R^1$  and  $R^2$  is not a hydrogen atom, or 6-formyl-pterin, i.e., the compound of the formula (I) wherein  $n$  is 0,  $R^1$  and  $R^2$  are hydrogen atoms at the same time, and  $X$  is a formyl group, per se, exhibits the active oxygen scavenging activity. Therefore, it is effective against active oxygens generated by various causes, regardless of systems wherein active oxygens are formed.

The pterin derivative of the formula (I) wherein  $n$  is an integer of 1 or more, particularly an integer of 1 to 100, may be slowly degraded to release 6-formyl-pterin in the body or on the surface of the body of an animal to which it is administered. Therefore, it is effective against active oxygens generated by various causes regardless of systems wherein active oxygens are formed.

Accordingly, the pharmaceutical composition of the present invention may be used to effectively treat or prevent various diseases which an active oxygen or radical is implicated in, for

example, ischemic disorder (such as sequela of ischemic heart disease, sequela of cerebral infarction, or stress ulcers), reperfusion disorder, inflammatory disease (such as chronic rheumatism, nephritis, or asthma), cancer, diabetes, cataract, arteriosclerosis, drug toxinoses, pesticide toxinoses, hepatopathy by an excess administration of a drug or an excess taking up of a pesticide, retinopathy of prematurity, hyperesthesia optica, or disorder caused by radiation.

It is possible to administer the pharmaceutical composition according to the present invention, i.e., the pterin derivative or the pharmaceutically acceptable salt thereof, alone or preferably together with a pharmaceutically or veterinarily acceptable ordinary carrier, to an animal, preferably a mammal, particularly humans.

The formulation is not limited to, but may be, for example, oral medicines, such as powders, fine subtilees, granules, tablets, capsules, suspensions, emulsions, syrups, extracts or pills, or parenteral medicines, such as injections, liquids for external use, ointments, suppositories, creams for topical application, jellies, gels, pastes, or eye lotions.

The oral medicines may be prepared by an ordinary method using, for example, fillers, binders, disintegrating agents, surfactants, lubricants, flowability-enhancers, diluting agents, preservatives, coloring agents, perfumes, tasting agents, stabilizers, humectants, antiseptics, antioxidants, or the like, such as gelatin, sodium alginate, starch, corn starch, saccharose, lactose, glucose, mannitol, carboxymethylcellulose, dextrin, polyvinyl pyrrolidone, crystalline cellulose, soybean lecithin, sucrose, fatty acid esters, talc, magnesium stearate, polyethylene glycol, magnesium silicate, silicic anhydride, or synthetic aluminum silicate. For example, the capsule may be prepared by mixing and filling 6-formyl-pterin and lactose.

For the parenteral administration, for example, a topical application in the form of a cream or ointment, an injection such as a subcutaneous or intravenous injection, or the per rectum administration may be used. Of the parenteral formulations, an injection is preferably used.

When the injections are prepared, for example, water-

soluble solvents, such as physiological saline or Ringer's solution, water-insoluble solvents, such as plant oil or fatty acid ester, tonicity agents, such as glucose or sodium chloride, solubilizing agents, stabilizing agents, antiseptics, suspending agents, emulsifying agents or the like may be optionally used, in addition to the pterin derivative as the active ingredient.

The pharmaceutical composition may be administered in the form of a sustained release preparation using sustained release polymers. For example, the pharmaceutical composition of the present invention may be incorporated into a pellet made of ethylenevinyl acetate polymers, and the pellet may be surgically implanted in a tissue to be treated.

The amount of the pterin derivative or the pharmaceutically acceptable salt thereof contained in the pharmaceutical composition of the present invention is not limited, but the pharmaceutical composition may contain 0.01 to 99%, preferably 0.1 to 80% by weight of the pterin derivative or the pharmaceutically acceptable salt thereof.

When the active oxygen scavenging activity is utilized, the dose of the pharmaceutical composition of the present invention varies with the kind of disease, the age, sex, body weight, symptoms, method of administration, or the like, but the pterin derivative may be orally or parenterally administered at a dosage of about 0.1 mg to 100 mg (calculated as 6-formyl-pterin) a day for an adult, usually once or divided into up to four dosages.

The pterin derivative of the formula (I), or the cyclic compound thereof, or the pharmaceutically acceptable salt thereof exhibits the active oxygen scavenging activity or may be converted to a compound exhibiting the active oxygen scavenging activity, and thus may be used as the active ingredient of the cosmetic composition of the present invention. Because skin is on the outermost layer of a living body, it is affected by an active oxygen generated by environmental factors, particularly the action of ultraviolet light. As dermatopathy affected by an active oxygen, there may be mentioned, for example, inflammatory dermatopathy, collagen disease, keratosis, hydroa, or hyperesthesia optica. It is known that keratin of skin

functions as a barrier, and therefore, when agents for external use, such as cosmetics, are administered, the active ingredient acts mainly on the surface of skin, and thus, effectively suppresses, for example, peroxidation of lipids on the surface of skin. Accordingly, the cosmetic composition of the present invention can scavenge active oxygens which may be generated on the surface of skin by the action of ultraviolet light, radiation, nitrogen dioxide, or cigarette smoke to avoid, reduce, or prevent skin damage caused by the active oxygens.

The amount of the pterin derivative of the formula (I), or the cyclic compound thereof, or the salt thereof contained in the cosmetic composition of the present invention is not limited, but the cosmetic composition may contain 0.01 to 99%, preferably 0.1 to 80% by weight of the pterin derivative of the formula (I), or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.

In addition to the active ingredient, the cosmetic composition of the present invention may optionally contain one or more other ingredients ordinarily used for cosmetics, for example, oils, antioxidants, surfactants, humectants, perfumes, water, alcohols, thickeners, antiseptics, mildewproofing agents, coloring agents, powders, and/or medicines. Further, the cosmetic composition of the present invention may optionally contain, if necessary, well-known ultraviolet light absorbers, for example, benzoic acid-based ultraviolet light absorbers (such as p-aminobenzoic acid), anthranilic acid-based ultraviolet light absorbers (such as homomethyl-N-acetylanthranilate), salicylic acid-based ultraviolet light absorbers (such as amylsalicylate), cinnamic acid-based ultraviolet light absorbers (such as octyl cinnamate), and/or benzophenone-based ultraviolet light absorbers (such as 2,4-dihydroxybenzophenone).

The cosmetic composition of the present invention may be in the form of, for example, solutions, emulsions, pasty mixtures, solids (pressed solids), powders, or the like. The cosmetic composition of the present invention may be used as, for example, tanners, sun-blocking cosmetics, make-up bases, packs, lotions, foundations, creams, emulsions, shampoos, rinses, hair

cosmetics, or the like. As described above, an excess of active oxygens may be generated under strong ultraviolet light, and therefore, it is preferable to use the cosmetic composition of the present invention as tanners or sun-blocking cosmetics for use under strong ultraviolet light, for example, sun oils, sun lotions, sunsceeens, sun-blocking creams, sun-blocking lotions, sun-blocking foundations, sun-blocking make-up bases, or sun-blocking hair tonics.

Acute toxicity of 6-formyl-pterin was examined, using rats. After 6 mg/kg (body weight) of 6-formyl-pterin was administered intravenously to 10 rats, the conditions of them were observed for 3 months. No death was observed.

The active oxygen scavenger of the present invention may be used not only for the pharmaceutical or cosmetic application but also for various applications, for example, as food such as a functional food or health food, as a feed for non-human animals, particularly breeding animals, or as an additive for a solution to preserve an organ to be transplanted.

#### EXAMPLES

The present invention now will be further illustrated by, but is by no means limited to, the following Examples.

##### Example 1: Measurement of active oxygen scavenging activity of 6-formyl-pterin (PMN-PMA system)

Venous blood (10 ml) was taken from a healthy adult, and polymorphonuclear leukocytes (abbreviated to PMN) were isolated therefrom. The leukocytes were suspended in HBSS (Hanks' balanced salt solution) to approximately  $1 \times 10^6$  cells/ml. 2-Methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo-(1,2-a)-pyrazin-3-on (hereinafter referred to as CLA) as a chemiluminescent compound, that is, a compound which may generate chemiluminescence due to the presence of active oxygens, was dissolved in a phosphate buffered saline (hereinafter referred to as PBS) to the concentration of 50  $\mu\text{M}$ . Phorbol myristate acetate (abbreviated to PMA) as a polymorphonuclear leukocyte stimulating agent, that is, a compound which may generate active oxygens by stimulating polymorphonuclear leukocytes, was dissolved in PBS to the concentration of 20  $\mu\text{g/ml}$ . The PMN suspension, the CLA

solution, and the PMA solution were cooled with ice for storage until use for measurement.

6-Formyl-pterin as the active ingredient of the active oxygen scavenger according to the present invention was dissolved in PBS to the concentrations of 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , or 500  $\mu\text{M}$ , and then warmed to 37°C before measurement. PBS as a control was also warmed to 37°C before measurement.

The measurement was performed as follows:

To polymorphonuclear leukocytes isolated from 2 ml of the PMN suspension by centrifugation, the 6-formyl-pterin solutions of various concentrations or PBS were added to adjust total volume to 1930  $\mu\text{l}$ . The mixtures were poured into test tubes and warmed at 37°C for 15 minutes. After adding the CLA solution (50  $\mu\text{l}$ ), the mixture was placed in a chemiluminescence reader and the measurement of an amount of chemiluminescence was started. After 1 minute from the beginning of the measurement, the PMA solution (20  $\mu\text{l}$ ) was injected into the test tube with a syringe. The measurement was performed at 37°C for approximately 10 minutes while monitoring every 10 seconds.

The results are shown in Figure 1. Figure 1 is a graph showing a total chemiluminescence amount obtained by accumulating chemiluminescence amounts measured every 10 seconds. In Figure 1, the curve a shows the result of the control test wherein only PBS was added instead of 6-formyl-pterin, the curve b shows the result of the test wherein 100  $\mu\text{M}$  of 6-formyl-pterin was added, the curve c shows the result of the test wherein 250  $\mu\text{M}$  of 6-formyl-pterin was added, and the curve d shows the result of the test wherein 500  $\mu\text{M}$  of 6-formyl-pterin was added. In comparison with the control test wherein only PBS was added instead of 6-formyl-pterin (the curve a), the amount of chemiluminescence, i.e., the amount of active oxygens, was significantly suppressed, in the test wherein 100  $\mu\text{M}$  of 6-formyl-pterin was added (the curve b), and further, the amount of chemiluminescence, i.e., the amount of active oxygens almost disappeared in the tests wherein 250  $\mu\text{M}$  of 6-formyl-pterin (the curve c) or 500  $\mu\text{M}$  of 6-formyl-pterin (the curve d) was added.

Example 2: Measurement of active oxygen scavenging activity of 6-formyl-pterin (active oxygen derived from potassium superoxide)

Potassium superoxide ( $\text{KO}_2$ ) (28 mg) was added to dimethyl sulfoxide (DMSO) (20 ml) to prepare a saturated solution so that active oxygens were generated in DMSO. As a standard substance, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxide (TEMPO) was used. TEMPO was dissolved in DMSO in the concentrations of 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 1.2, or 1.5 mM. The electron spin resonance signals obtained (measured at 77K) were integrated to prepare a standard curve. The concentration of active oxygens in DMSO was determined by comparing the standard curve to be approximately 0.5 mM.

6-Formyl-pterin as the active ingredient of the active oxygen scavenger according to the present invention was dissolved in DMSO in the concentration of 10 mM. The amount of active oxygens generated in the absence of 6-formyl-pterin in the  $\text{KO}_2$  solution (control), and the amount of active oxygens generated in the presence of predetermined concentrations of 6-formyl-pterin were measured by the liquid He temperature (77K) electron spin resonance spectroscopy, respectively.

The results are shown in Figure 2. The amount of active oxygens generated from  $\text{KO}_2$  when the final concentrations of 6-formyl-pterin in DMSO were raised from 0.001 mM to 1 mM in a graduated manner by 10 times can be determined from the value calculated by integrating twice a peak (first-derivative spectrum) at the position of arrow A, i.e., the position of 328 mT. In Figure 2, the curve a shows the result when 6-formyl-pterin was not added (control), and the curves b to e show the results when 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, and 1 mM of 6-formyl-pterin was added, respectively.

When 6-formyl-pterin was added to the  $\text{KO}_2$  solution, in comparison with the case that 6-formyl-pterin was not added to the  $\text{KO}_2$  solution, the amount of active oxygens generated from  $\text{KO}_2$  was lowered from 0.1 mM 6-formyl-pterin, and the amount of active oxygens generated from  $\text{KO}_2$  almost disappeared at 1 mM 6-formyl-pterin.

As confirmed above, the amount of active oxygens generated

from the system wherein  $\text{KO}_2$  (28 mg) was added to DMSO (20 ml) was approximately 0.5 mM. Accordingly, the results show that 6-formyl-pterin scavenged active oxygens generated from  $\text{KO}_2$  in a ratio of approximately 1:1.

Example 3: Measurement of active oxygen scavenging activity of a hydroxymethyl derivative (active oxygen derived from potassium superoxide)

The procedure described in Example 2 was repeated, except that 0.01 mM to 10 mM of 6-hydroxymethyl-pterin [i.e., a compound of the formula (I) wherein  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  are hydrogen atoms, X is a hydroxymethyl group, and n is 0] was used instead of 0.001 mM to 1 mM of 6-formyl-pterin, to find that the active oxygen scavenging activity of 6-hydroxymethyl-pterin was the same as that of 6-formyl-pterin when the concentration of 6-hydroxymethyl-pterin was 10 times that of 6-formyl-pterin.

Example 4: Suppression of delayed neuronal death, by active oxygen scavenging activity

A neck of each gerbil (body weigh = approximately 80 g) under a general anesthesia was incised. Ambilateral carotids were visually ligated with clips to cut off a bloodstream. After 5 minutes, the bloodstream was resumed, and the incision was sutured. After 30 minutes from the resumption of the bloodstream, physiological saline (1 ml) was intraperitoneally administered to a control group of the gerbils, whereas 50mM of 6-formyl-pterin in physiological saline (1 ml) was intraperitoneally administered to an administering group of the gerbils. Thereafter, gerbils came out from anesthesia and then were bred for 1 week. Then, a brain was extirpated from each gerbil under a general anesthesia. Tissue slices were prepared from the brain and stained with microtubule-associated protein 2 (MAP2) which can specifically stain neurons, to evaluate the degree of delayed neuronal death (DND) in the cerebral hippocampus area.

Photomicrographs of the tissue slices of the cerebral hippocampus area of the gerbils are shown in Figures 3 to 5. Figure 3 is a photomicrograph of a slice of a cerebral hippocampus tissue from a completely normal gerbil which had not encountered hemostasis, Figure 4 is a photomicrograph of a slice

of a cerebral hippocampus tissue from the control group, and Figure 5 is a photomicrograph of a slice of a cerebral hippocampus tissue from the 6-formyl-pterin-administering group. Figure 3(1), Figure 4(1), and Figure 5(1) are photomicrographs having a magnification of approximately x60, and Figure 3(2), Figure 4(2), and Figure 5(2) are photomicrographs having a magnification of approximately x600.

Figure 4 shows the state where neurons were completely dropped, and Figure 5 shows the state where many neurons were living. These results show that delayed neuronal death was suppressed by the active oxygen scavenging activity of 6-formyl-pterin in the gerbils which had suffered from the transient cerebral ischemia.

#### INDUSTRIAL APPLICABILITY

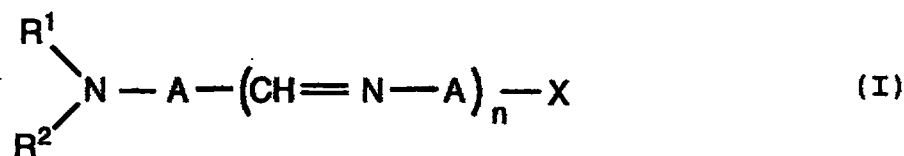
The active oxygen scavenger of the present invention is widely effective against active oxygens generated by various causes. Therefore, the pharmaceutical composition of the present invention containing the active oxygen scavenger are expected to effectively treat various diseases which an active oxygen would be implicated in. Further, the cosmetic composition of the present invention containing the active oxygen scavenger are expected to reduce or avoid adverse influence of active oxygens generated by the action of ultraviolet light or the like.



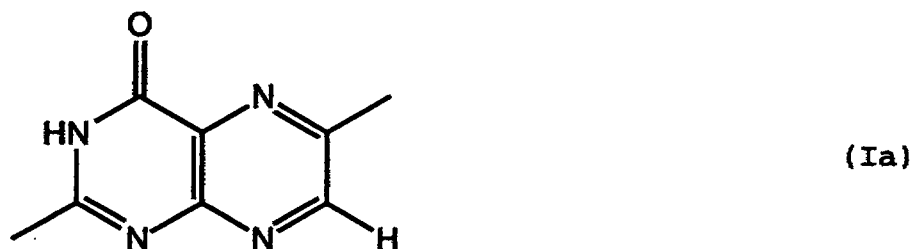
THIS SHEET HAS BEEN  
REPLACED

CLAIMS

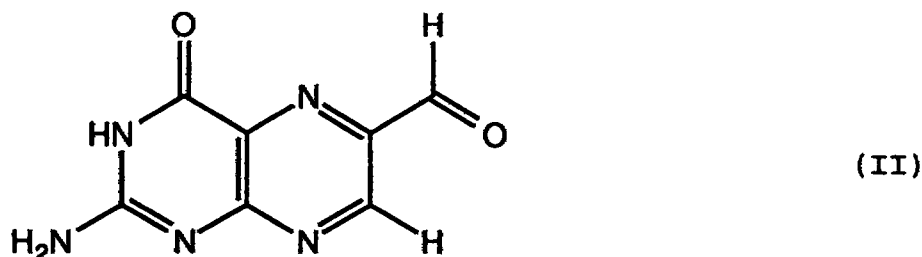
1. An active oxygen scavenger characterized by comprising as an active ingredient a pterin derivative of the formula (I):



wherein  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  are independently a hydrogen atom, an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, or an acyl group of the formula  $\text{R}^3\text{-CO-}$ ,  $\text{R}^3$  is an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms,  $\text{X}$  is a formyl or hydroxymethyl group,  $\text{A}$  is a group of the formula (Ia):



- and  $n$  is 0 or an integer of 1 or more, with the proviso that when  $\text{X}$  is a hydroxymethyl group,  $n$  is 0, or when  $n$  is an integer of 1 or more, each of  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  is a hydrogen atom, and  $\text{X}$  is a formyl group, or a cyclic compound thereof, or a salt thereof.
2. The active oxygen scavenger according to claim 1, comprising as an active ingredient 6-formyl-pterin of the formula (II):



or a salt thereof.

This Sheet Has Been Replaced





THIS SHEET HAS BEEN  
REPLACED

3. A pharmaceutical composition characterized by comprising as an active ingredient the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
4. The pharmaceutical composition according to claim 3, which is an agent for treating a disease which an active oxygen is implicated in.
5. The pharmaceutical composition according to claim 4, wherein the disease which an active oxygen is implicated in is ischemic disorder, reperfusion disorder, inflammatory disease, cancer, diabetes, cataract, arteriosclerosis, drug toxinosis, pesticide toxinosis, hepatopathy caused by an excess administration of a drug or an excess taking-up of a pesticide, retinopathy of prematurity, hyperesthesia optica, or disorder caused by radiation.
6. A cosmetic composition characterized by comprising the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.
7. A functional food for preventing or treating a disease which an active oxygen is implicated in, characterized by comprising the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.
8. A feed for preventing or treating a disease which an active oxygen is implicated in, characterized by comprising the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.
9. An additive for a liquid to preserve an organ, characterized by comprising the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.
10. A method for preventing or treating a disease which an active oxygen is implicated in, comprising administering to a mammal in need thereof the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof in an amount effective therefor.
11. Use of the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof for preparing a pharmaceutical composition.

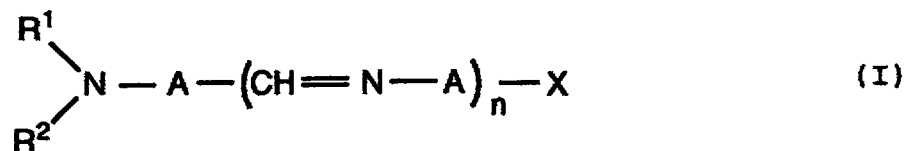
This Sheet Has Been Replaced



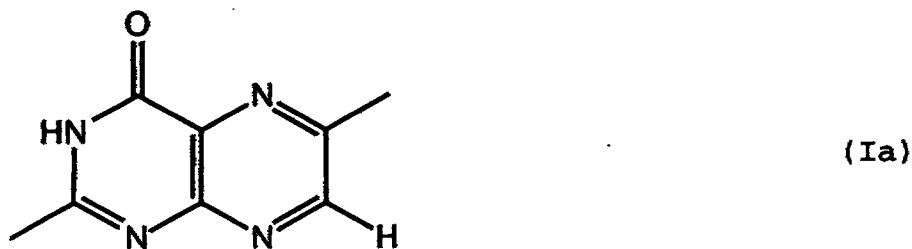
THIS SHEET HAS BEEN  
REPLACED

ABSTRACT

An active oxygen scavenger comprising as an active ingredient a pterin derivative of the formula (I):



wherein  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  are independently a hydrogen atom, an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, or an acyl group of the formula  $\text{R}^3\text{-CO-}$ ,  $\text{R}^3$  is an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, X is a formyl group or hydroxymethyl group, A is a group of the formula (Ia):



and n is 0 or an integer of 1 or more, with the proviso that when X is a hydroxymethyl group, n is 0, or when n is an integer of 1 or more, each of  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  is a hydrogen atoms, and X is a formyl group, or a cyclic compound thereof, or a salt thereof is disclosed.

FIG. 1

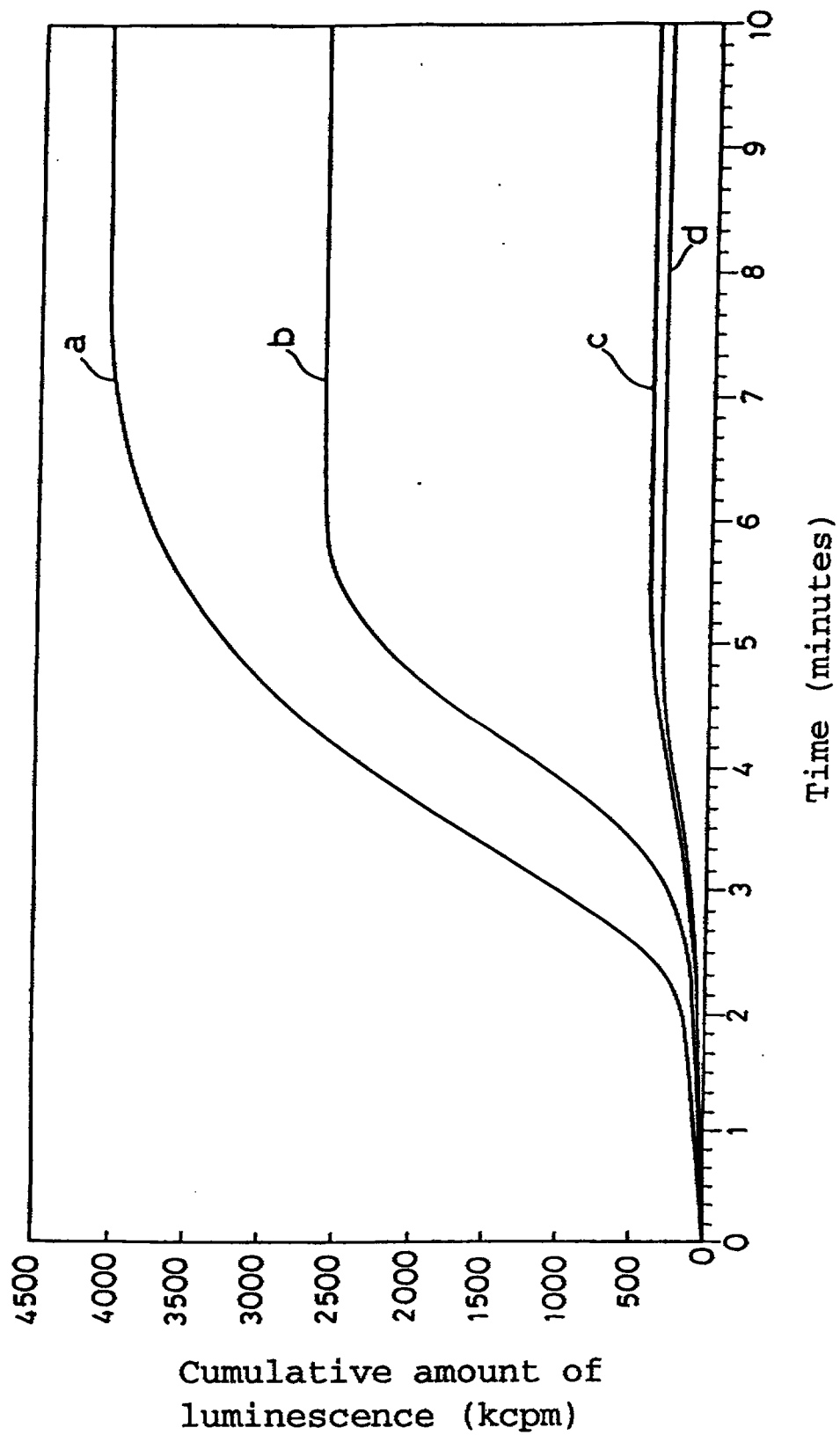
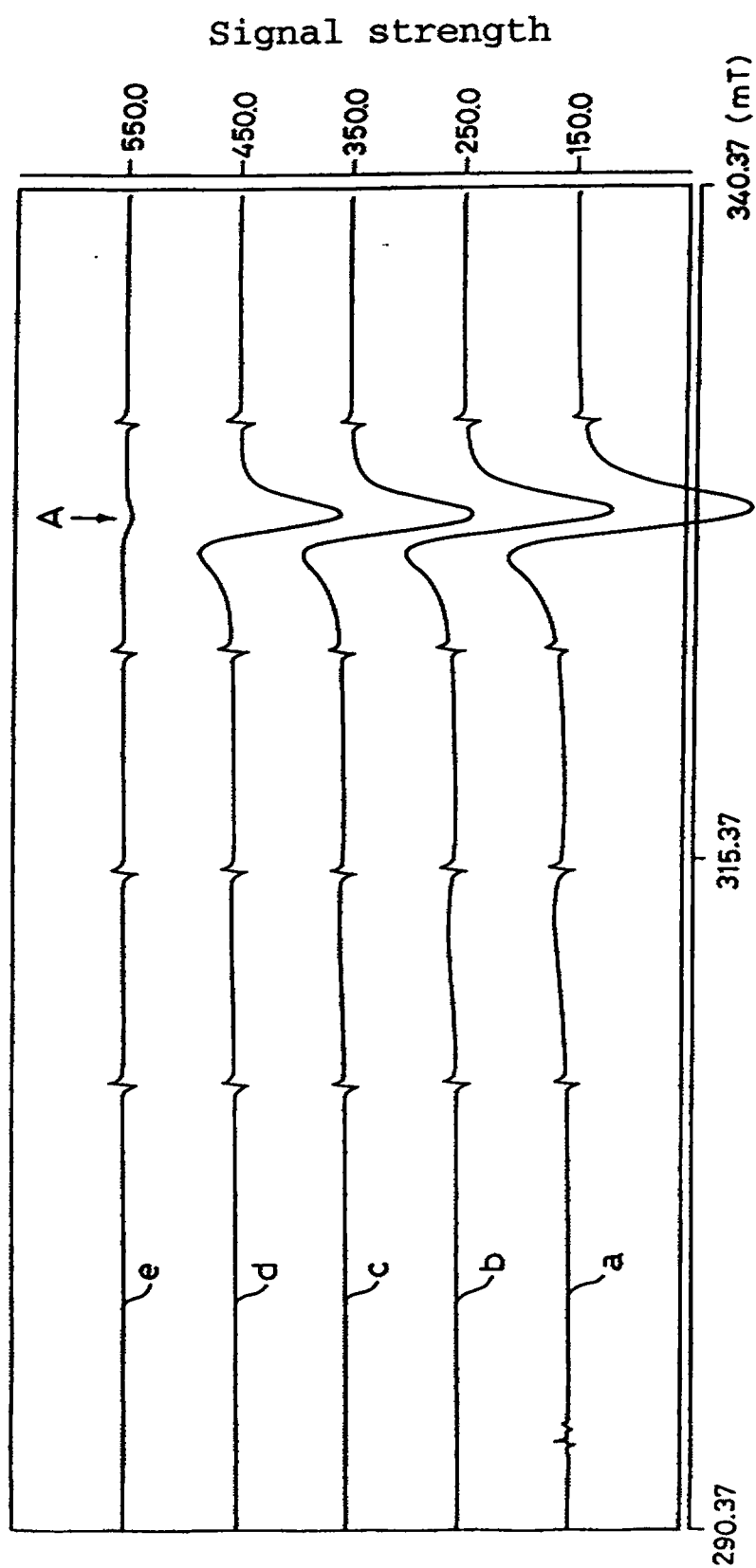


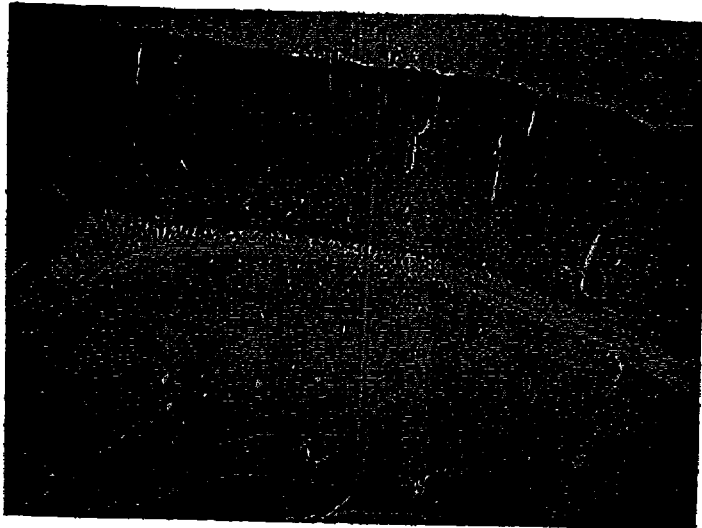
FIG. 2



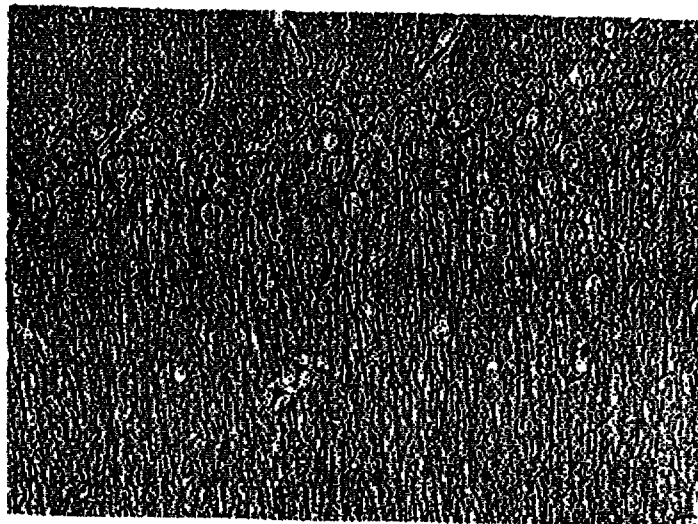
3 / 5

FIG. 3

(1)



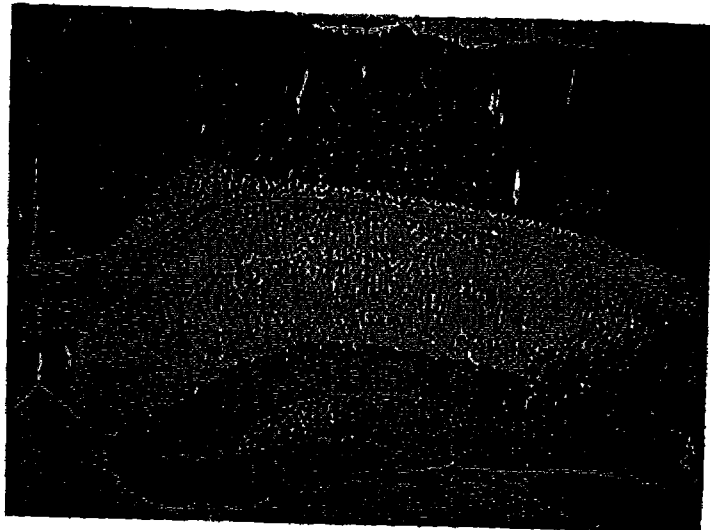
(2)



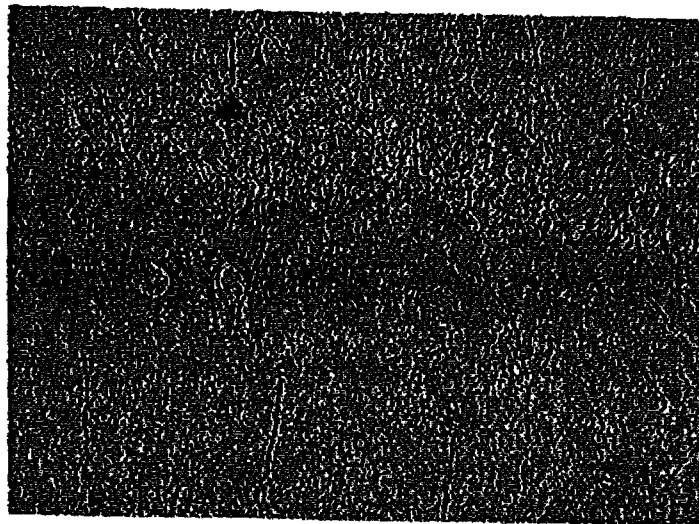
4 / 5

FIG. 4

(1)



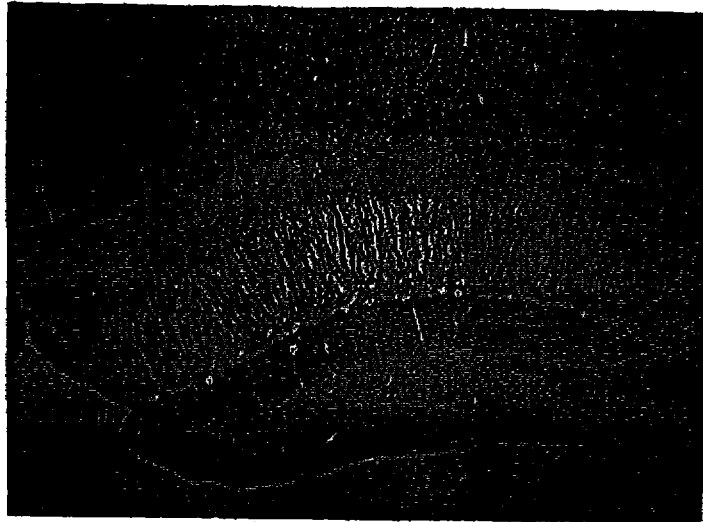
(2)



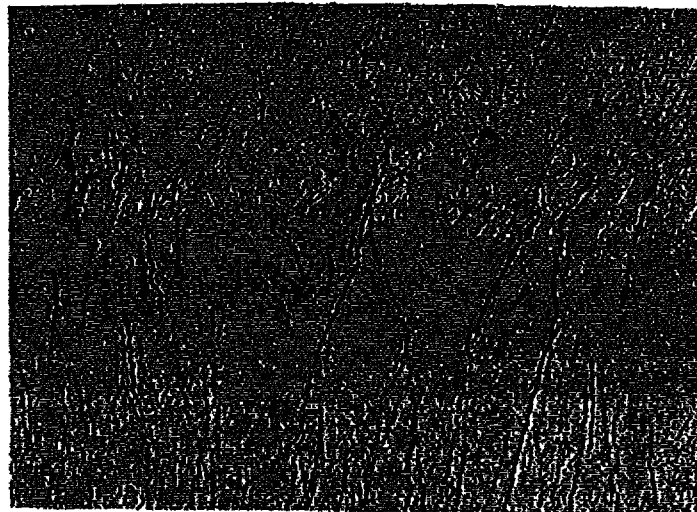
5 / 5

F I G. 5

(1)



(2)

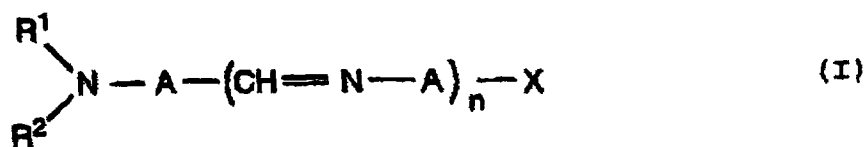




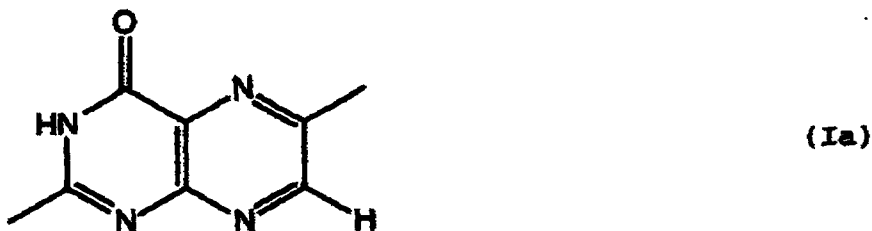
-15-

CLAIMS

1. An active oxygen scavenger comprising as an active ingredient a pterin derivative of the formula (I):



wherein  $R^1$  and  $R^2$  are independently a hydrogen atom, an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, or an acyl group of the formula  $R^3-CO-$ ,  $R^3$  is an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, X is a formyl group, A is a group of the formula (Ia):



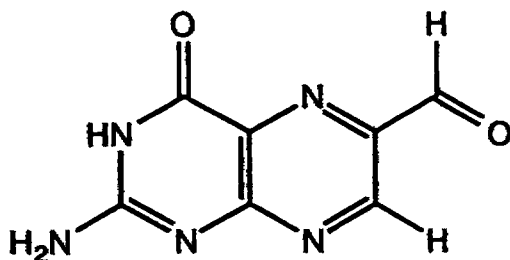
and n is 0 or an integer of 1 or more, with the proviso that when n is an integer of 1 or more, each of  $R^1$  and  $R^2$  is a hydrogen atom, or a cyclic compound thereof, or a salt thereof.

16/5/00  
9802350-0

|                   |
|-------------------|
| REPLACEMENT SHEET |
| DATE: 16 MAY 2000 |



2. The active oxygen scavenger according to claim 1, comprising as an active ingredient 6-formyl-pterin of the formula (II):



(II)

or a salt thereof.

3. A pharmaceutical composition for treating a disease which an active oxygen is implicated in, comprising as an active ingredient the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
4. The pharmaceutical composition according to claim 4, wherein the disease which an active oxygen is implicated in is ischemic disorder, reperfusion disorder, inflammatory disease, cancer, diabetes, cataract, arteriosclerosis, drug toxinosis, pesticide toxinosis, hepatopathy caused by an excess administration of a drug or an excess taking-up of a pesticide, retinopathy of prematurity, hyperesthesia optica, or disorder caused by radiation.

REPLACEMENT SHEET

DATE: 15 MAY 2000



-17-

5. A cosmetic composition for treating a disease which an active oxygen is implicated in, comprising the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.
6. A functional food for preventing or treating a disease which an active oxygen is implicated in, characterized by comprising the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.
7. A feed for preventing or treating a disease which an active oxygen is implicated in, characterized by comprising the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.
8. An additive for a liquid to preserve an organ, characterized by comprising the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof.
9. Use of the pterin derivative of the formula (I) according to claim 1, or the cyclic compound thereof, or the salt thereof for preparing a pharmaceutical

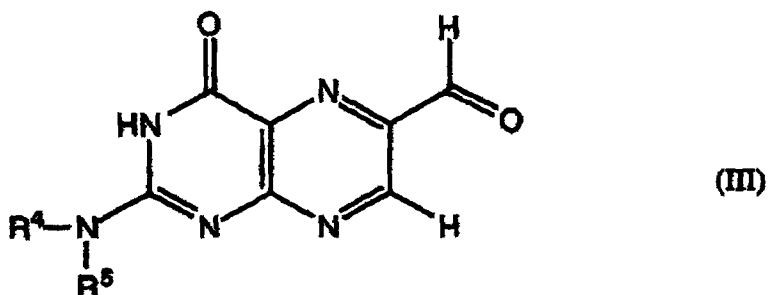
REPLACEMENT SHEET

DATE: 16 MAY 2000



composition for treating a disease which an active oxygen is implicated in.

10. A pterin derivative of the formula (III):



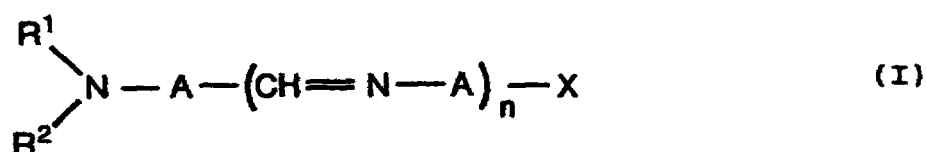
wherein  $R^4$  and  $R^5$  are independently a hydrogen atom, an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, or an acyl group of the formula  $R^6$ -CO-, and  $R^6$  is an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, with the proviso that  $R^4$  and  $R^5$  are not hydrogen atoms at the same time.

REPLACEMENT SHEET  
DATE: 15 MAY 2000

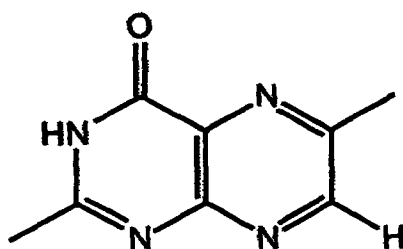
ABSTRACT

ACTIVE OXYGEN SCAVENGERS CONTAINING PTERIN DERIVATIVES

An active oxygen scavenger comprising as an active ingredient a pterin derivative of the formula (I):



wherein  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  are independently a hydrogen atom, an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, or an acyl group of the formula  $\text{R}^3\text{-CO-}$ ,  $\text{R}^3$  is an alkyl group of 1 to 4 carbon atoms, X is a formyl group, A is a group of the formula (Ia):



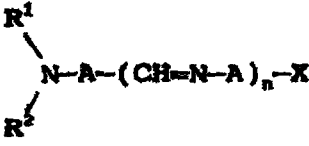
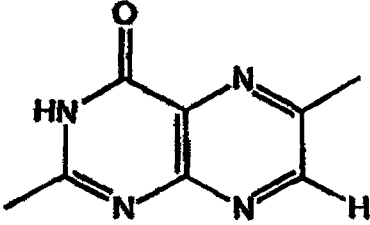
(Ia)

and n is 0 or an integer of 1 or more, with the proviso that when n is an integer of 1 or more, each of  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  is a hydrogen atom, or a cyclic compound thereof, or a salt thereof.



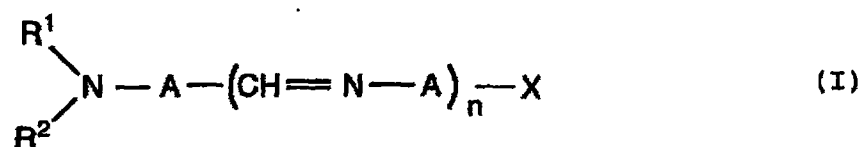
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

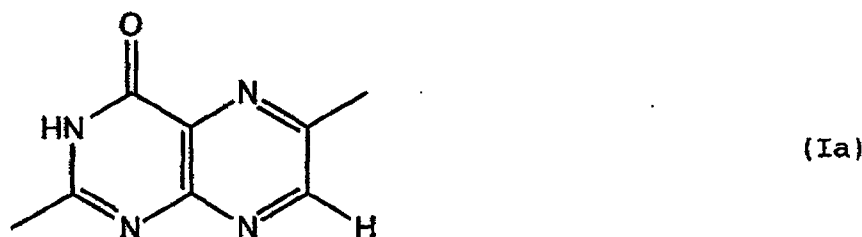
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                       |                                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(51) 国際特許分類</b><br>C07D 475/00, A61K 30/505, 7/00, 7/48,<br>A23K 1/30                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>A1</b>                                                                                                                                                                             | <b>(11) 国際公開番号</b><br>WO98/04558<br><br><b>(43) 国際公開日</b><br>1998年2月5日(05.02.98) |
| <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP97/02649<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1997年7月30日(30.07.97)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平8/218043 1996年7月31日(31.07.96) JP<br><br><b>(71) 出願人</b> (米国を除くすべての指定国について)<br>株式会社 アルテミス(ARTEMIS, INC.)[JP/JP]<br>〒150 東京都渋谷区広尾三丁目15番2号 Tokyo, (JP)<br><b>(72) 発明者</b> ; および<br><b>(75) 発明者/出願人</b> (米国についてのみ)<br>荒井俊之(ARAI, Toshiyuki)[JP/JP]<br>〒606 京都府京都市左京区岡崎西福ノ川町26-46 Kyoto, (JP)<br>牧野圭祐(MAKINO, Keisuke)[JP/JP]<br>〒606 京都府京都市左京区上高野西明寺山33-24 Kyoto, (JP)<br>森健次郎(MORI, Kenjiro)[JP/JP]<br>〒606 京都府京都市左京区松ヶ崎三反長町10-1 Kyoto, (JP)<br><b>(74) 代理人</b><br>弁理士 森田憲一(MORITA, Kenichi)<br>〒173 東京都板橋区板橋二丁目67番8号<br>板橋中央ビル5階 Tokyo, (JP)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>(81) 指定国</b> AU, CA, CN, IL, IS, JP, KR, MX, NO, NZ, PL,<br>RU, SG, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR,<br>GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br>添付公開書類<br>国際調査報告書 |                                                                                  |
| <b>(54) Title: ACTIVE OXYGEN SCAVENGERS CONTAINING PTERIN DERIVATIVES</b><br><br><b>(54) 発明の名称</b> プテリン誘導体含有活性酸素消去剤<br><br><b>(57) Abstract</b><br>Active oxygen scavengers containing as the active ingredient pterin derivatives represented by general formula (I) which are optionally cyclized or salts thereof, wherein R <sup>1</sup> and R <sup>2</sup> represent each hydrogen, C <sub>1-4</sub> alkyl or acyl represented by the general formula R <sup>3</sup> -CO- (wherein R <sup>3</sup> represents C <sub>1-4</sub> alkyl); X represents formyl or hydroxymethyl; A represents a group represented by formula (Ia), and n is 0 or an integer of 1 or above; provided that n is 0 when X is hydroxymethyl and that R <sup>1</sup> and R <sup>2</sup> are each hydrogen and X is formyl when n is an integer of 1 or above.<br><div style="text-align: center;"><br/>(I)</div> <div style="text-align: center;"><br/>(Ia)</div> |                                                                                                                                                                                       |                                                                                  |

(57) 要約

式 (I) :



〔式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、水素原子、炭素数1～4のアルキル基、又は式  $R^3$   $-CO-$  ( $R^3$  は炭素数1～4のアルキル基である) で表されるアシル基であり、 $X$ は、ホルミル基又はヒドロキシメチル基であり、 $A$ は式 (Ia) :



で表される基であり、 $n$ は0又は1以上の整数であるが、但し、 $X$ がヒドロキシメチル基である場合には、 $n$ は0であるものとし、 $n$ が1以上の整数である場合には、 $R^1$  及び  $R^2$  は水素原子であり、 $X$ はホルミル基であるものとする〕で表されるプテリン誘導体、若しくはその環状体、又はその塩を有効成分として含有する活性酸素消去剤を開示する。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

|    |              |    |             |    |          |    |            |
|----|--------------|----|-------------|----|----------|----|------------|
| AL | アルバニア        | ES | スペイン        | LR | リベリア     | SG | シンガポール     |
| AM | アルメニア        | FI | フィンランド      | LS | レソト      | SI | スロヴェニア     |
| AT | オーストリア       | FR | フランス        | LT | リトアニア    | SK | スロヴァキア共和国  |
| AU | オーストラリア      | GA | ガボン         | LU | ルクセンブルグ  | SL | シエラレオネ     |
| AZ | アゼルバイジャン     | GB | 英国          | LV | ラトヴィア    | SN | セネガル       |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア        | MC | モナコ      | SZ | スワジランド     |
| BB | バルバドス        | GH | ガーナ         | MD | モルドヴァ共和国 | TD | チャード       |
| BE | ベルギー         | GM | ガンビア        | MG | マダガスカル   | TG | トーゴ        |
| BF | ブルキナ・ファソ     | GN | ギニア         | MK | マケドニア共和国 | TJ | タジキスタン     |
| BG | ブルガリア        | GR | ギリシャ        |    | ラヴィア共和国  | TM | トルクメニスタン   |
| BJ | ベナン          | HU | ハンガリー       | ML | マリ       | TR | トルコ        |
| BR | ブラジル         | ID | インドネシア      |    | モンゴル     | TT | トリニダード・トバゴ |
| BY | ベラルーシ        | IE | アイルランド      | MR | モーリタニア   | UA | ウクライナ      |
| CA | カナダ          | IL | イスラエル       | MW | マラウイ     | UG | ウガンダ       |
| CF | 中央アフリカ共和国    | IS | アイスランド      | MX | メキシコ     | US | 米国         |
| CG | コンゴ          | IT | イタリア        | NE | ニジェール    | UZ | ウズベキスタン    |
| CH | スイス          | JP | 日本          | NL | オランダ     | VN | ヴェトナム      |
| CI | コート・ジボアール    | KE | ケニア         | NO | ノルウェー    | YU | ユーゴスラビア    |
| CM | カメルーン        | KG | キルギスタン      | NZ | ニュージーランド | ZW | ジンバブエ      |
| CN | 中国           | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | PL | ポーランド    |    |            |
| CU | キューバ         | KR | 大韓民国        | PT | ポルトガル    |    |            |
| CZ | チェコ共和国       | KZ | カザフスタン      | RO | ルーマニア    |    |            |
| DE | ドイツ          | LC | セントルシア      | RU | ロシア連邦    |    |            |
| DK | デンマーク        | LI | リヒテンシュタイン   | SD | スーダン     |    |            |
| EE | エストニア        | LK | スリランカ       | SE | スウェーデン   |    |            |