

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5036548号  
(P5036548)

(45) 発行日 平成24年9月26日(2012.9.26)

(24) 登録日 平成24年7月13日(2012.7.13)

(51) Int.Cl.

F 1

C07C 401/00	(2006.01)	C 07 C 401/00	C S P
C07F 7/18	(2006.01)	C 07 F 7/18	W
A61K 31/592	(2006.01)	A 61 K 31/592	
A61P 17/06	(2006.01)	A 61 P 17/06	
A61P 35/02	(2006.01)	A 61 P 35/02	

請求項の数 11 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-543291 (P2007-543291)  
 (86) (22) 出願日 平成17年11月18日 (2005.11.18)  
 (65) 公表番号 特表2008-520710 (P2008-520710A)  
 (43) 公表日 平成20年6月19日 (2008.6.19)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2005/041888  
 (87) 國際公開番号 WO2006/057915  
 (87) 國際公開日 平成18年6月1日 (2006.6.1)  
 審査請求日 平成20年11月17日 (2008.11.17)  
 (31) 優先権主張番号 60/629,958  
 (32) 優先日 平成16年11月22日 (2004.11.22)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500517248  
 ウイスコンシン アラムニ リサーチ フ  
 ァンデーション  
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53  
 707-7365 マディソン ピオ  
 ボックス 7365  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 賢男  
 (74) 代理人 100084009  
 弁理士 小川 信夫  
 (74) 代理人 100084663  
 弁理士 箱田 篤  
 (74) 代理人 100093300  
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

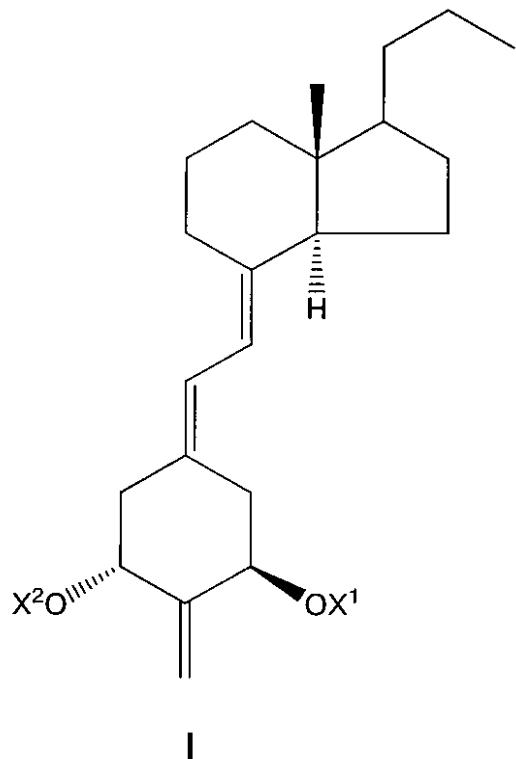
(54) 【発明の名称】 2-メチレン-19, 21-ジノル-1  $\alpha$ -ヒドロキシビスホモブレグナカルシフェロール

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記の式1を有する化合物：

【化1】



(式中、 $X^1$ および $X^2$ は、個々に、Hおよびヒドロキシ保護基から選ばれる)。

【請求項2】

$X^1$ および $X^2$ が、双方ともヒドロキシ保護基である、請求項1記載の化合物。

【請求項3】

$X^1$ および $X^2$ が、双方ともt-ブチルジメチルシリル基である、請求項2記載の化合物。

【請求項4】

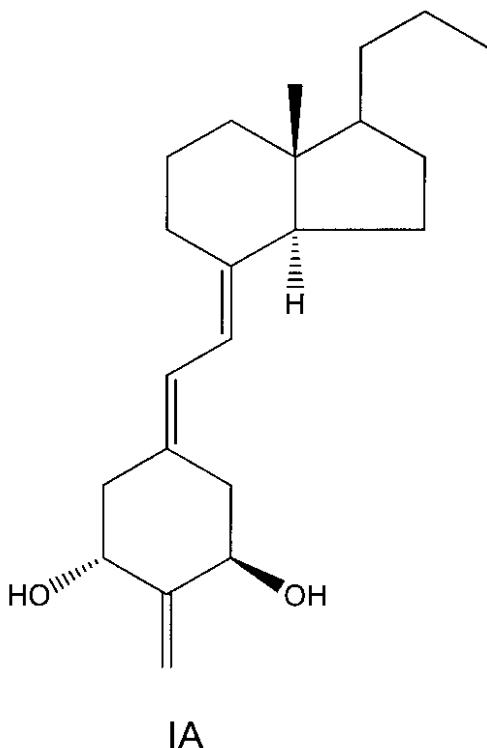
$X^1$ および $X^2$ が双方ともHであり、前記化合物が下記の式IAを有する、請求項1記載の化合物：

10

20

30

## 【化2】



## 【請求項5】

有効量の請求項4記載の化合物および製薬上許容し得る担体を含む製薬組成物。

## 【請求項6】

前記有効量が、前記組成物のグラム当り $0.01\text{ }\mu\text{g}\sim 1\text{ mg}$ の前記化合物を含む、請求項5記載の製薬組成物。

## 【請求項7】

前記有効量が、前記組成物のグラム当り $0.1\text{ }\mu\text{g}\sim 500\text{ }\mu\text{g}$ の前記化合物を含む、請求項5記載の製薬組成物。

## 【請求項8】

生物学的症状を患っている対象者を治療するための製薬組成物であって、有効量の請求項4記載の化合物を含み、前記生物学的症状が、乾癬；白血病；結腸がん；乳がん；前立腺がん；多発性硬化症；狼瘡；糖尿病；宿主対移植片反応；臓器移植拒絶反応；関節リウマチ、ぜんそくまたは炎症性腸疾患から選ばれた炎症性疾患；しわ、適切な皮膚締まりの欠如、適切な皮膚水和の欠如または不十分な皮脂分泌から選ばれた皮膚症状；腎性骨ジストロフィー；または骨粗しょう症から選ばれることを特徴とする製薬組成物。

## 【請求項9】

乾癬；白血病；結腸がん；乳がん；前立腺がん；多発性硬化症；狼瘡；糖尿病；宿主対移植片反応；臓器移植拒絶反応；関節リウマチ、ぜんそくまたは炎症性腸疾患から選ばれた炎症性疾患；しわ、適切な皮膚締まりの欠如、適切な皮膚水和の欠如または不十分な皮脂分泌から選ばれた皮膚症状；腎性骨ジストロフィー；または骨粗しょう症から選ばれる生物学的症状の治療用医薬品の製造における、請求項4記載の化合物の使用。

## 【請求項10】

$X^1$ および $X^2$ が双方ともHであり、前記化合物が下記の式IBを有する、請求項1記載の化合物：

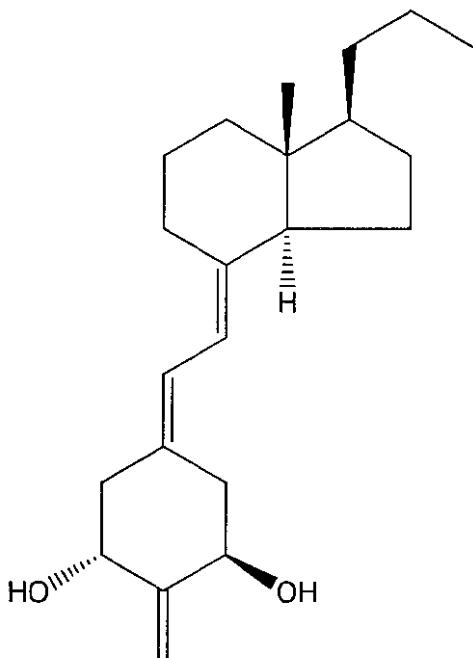
10

20

30

40

【化 3】



10

20

1B

## 【請求項 11】

生物学的症状を患っているヒト以外の対象者の治療方法であって、該対象者に有効量の請求項4又は10記載の化合物を投与することを含み、前記生物学的症状が、乾癬；白血病；結腸がん；乳がん；前立腺がん；多発性硬化症；狼瘡；糖尿病；宿主対移植片反応；臓器移植拒絶反応；関節リウマチ、ぜんそくまたは炎症性腸疾患から選ばれた炎症性疾患；しわ、適切な皮膚締まりの欠如、適切な皮膚水和の欠如または不十分な皮脂分泌から選ばれた皮膚症状；腎性骨ジストロフィー；または骨粗しょう症から選ばれることを特徴とする治療方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

[ 0 0 0 1 ]

(技術分野) 本発明は、ビタミンD化合物、さらに詳細には、2-メチレン-19-,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロール、およびこの化合物を含む製薬調合物に関する。また、本発明は、種々の疾患の治療において使用する医薬品の製造における、2-メチレン-19-,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロールまたはその塩の使用に関する。

40

用に口関する

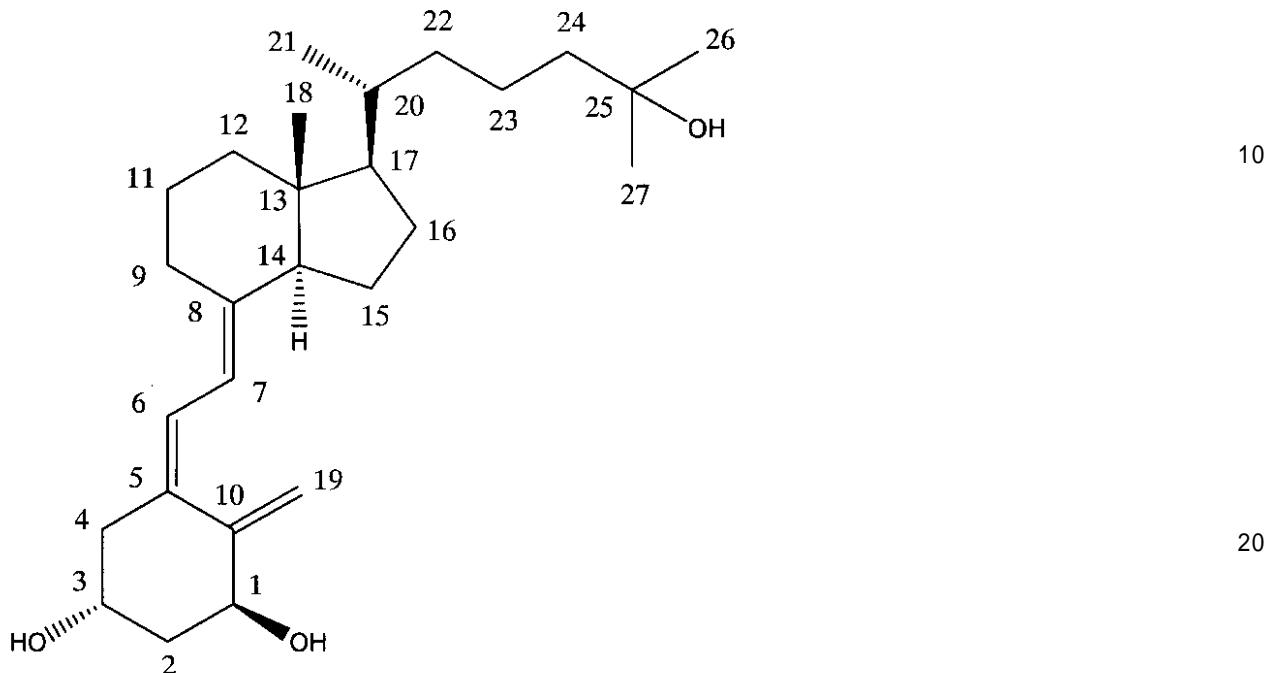
〔 0 0 0 2 〕

天然ホルモンの $1',25$ -ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> ( $1',25$ -ジヒドロキシコレカルシフェロールおよびカルシトリオールとしても知られている)およびそのエルゴステロール群のアナログ、即ち、 $1',25$ -ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>は、動物およびヒトにおけるカルシウムホメオスタシスの極めて強力なレギュレーターであることが知られており、さらに、細胞分化におけるそれらの活性も確証されている(Ostrem et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2610 (1987))。 $1'$ -ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、 $1'$ -ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>、各種側鎖同族化ビタミン類およびフッ素化アナログ類のようなこれら代謝産物の多くの構造的アナログ類が製造され、試験されている。これらの化合物の幾つかは、細胞分化およ

50

びカルシウム調節における興味ある分類の活性を示す。この活性の差異は、腎性骨ジストロフィー、ビタミンD抵抗性くる病、骨粗しょう症、乾癬およびある種の悪性腫瘍のような種々の疾患の治療において有用である。1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の構造およびこの化合物における各炭素原子を示すのに使用する番号付け方式を、下記に示す：

【化1】



1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> = 1,25-ジヒドロキシコレカルシフェロール = カルシトリオール

【0003】

もう1つの群のビタミンDアナログ類、即ち、いわゆる19-ノル-ビタミンD化合物は、ビタミンD系の典型的なA環環外メチレン基(炭素19)の2個の水素原子による置換に特徴を有する。そのような19-ノルアナログ類(例えば、1,25-ジヒドロキシ-19-ノル-ビタミンD<sub>3</sub>)の生物学的試験によれば、細胞分化の誘発において高効能を有する選択的活性プロフィール、および極めて低いカルシウム動員活性が明らかになっている。即ち、これらの化合物は、悪性腫瘍の治療用または種々の皮膚障害の治療用の治療薬として潜在的に有用である。そのような19-ノル-ビタミンDアナログ類の2つの異なる合成方法が開示されている(Perlman et al., Tetrahedron Lett. 31, 1823 (1990); Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991); およびDeLuca et al., U.S. Pat. No. 5,086,191)。

米国特許第4,666,634号においては、1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の2-ヒドロキシおよびアルコキシ(例えば、ED-71)アナログ類が、骨粗しょう症用の潜在的な薬物として、また、抗がん剤として、Chugaiグループによって開示され、試験されている。Okano et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1444 (1989)も参照されたい。1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の他の2-置換(ヒドロキシアルキル基(例えば、ED-120)およびフルオロアルキル基による)A環アナログ類も、製造され、試験されている(Miyamoto et al., Chem. Pharm. Bull. 41, 1111 (1993); Nishii et al., Osteoporosis Int. Suppl. 1, 190 (1993); Posner et al., J. Org. Chem. 59, 7855 (1994); および J. Org. Chem. 60, 4617 (1995))。

【0004】

また、1,25-ジヒドロキシ-19-ノル-ビタミンD<sub>3</sub>の各種2-置換アナログ類、即ち、ヒドロキシまたはアルコキシ基(DeLuca等の米国特許第5,536,713号)による、2-アルキル基(DeLuca等の米国特許第5,945,410号)による、および2-アルキリデン基(DeLuca等の米国特許第5,843,928号)による2-位置置換化合物も合成されており、これらの化合物は、興味のあ

10

20

30

40

50

る選択的活性プロフィールを示している。これらの研究は、全て、ビタミンDレセプター中の結合部位が合成ビタミンDアナログ類のC-2の種々の置換基を適合させていることを示唆している。

薬理学的に重要なビタミンD化合物の19-ノル群を探求する継続的な試みにおいては、炭素2 (C-2)でのメチレン置換基、炭素1 (C-1)でのヒドロキシル基、および炭素20 (C-20)へ結合させた短縮側鎖の存在に特徴を有するアナログ類が合成され、試験されている。1

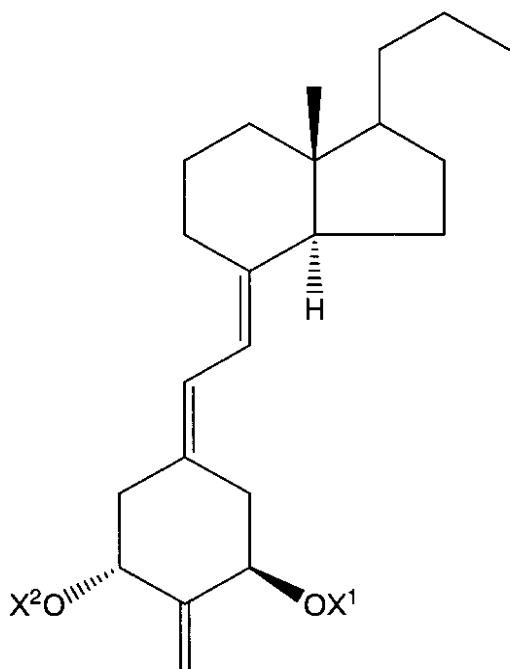
-ヒドロキシ-2-メチレン-19-ノル-プレグナカルシフェロールは米国特許第6,566,352号に記載されており、また、1'-ヒドロキシ-2-メチレン-19-ノル-(20S)-ホモプレグナカルシフェロールは米国特許第6,579,861号に記載されており、さらに、1'-ヒドロキシ-2-メチレン-19-ノル-ビスホモプレグナカルシフェロールは米国特許第6,627,622号に記載されている。これらの3つの化合物は、全て、ビタミンDレセプターに対する比較的高い結合活性および比較的高い細胞分化活性を有するが、1',25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>と比較した場合、カルシウム血症活性はあったとしても僅かである。これら化合物の生物学的活性により、これらの化合物は、上記352号、861号および622号米国特許において説明されているような種々の医薬用途における優れた候補となっている。

【 0 0 0 5 】

## (発明の開示)

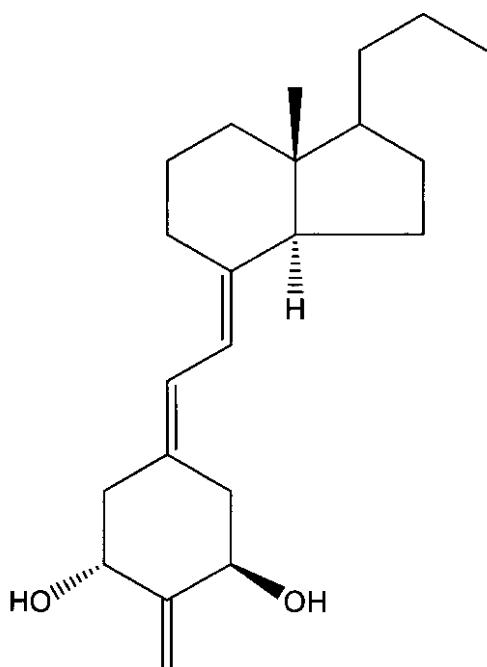
本発明は、2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロールおよび関連化合物、2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロールを含む製薬調合物、並びに種々の疾患症状を治療するのに使用する医薬品の製造におけるこの化合物の使用を提供する。

従って、1つの局面において、本発明は、下記に示す式1を有する化合物を提供する：  
【化2】



上記式中、 $X^1$ および $X^2$ は、同一または異なるものであり得、個々に、Hまたはヒドロキシ保護基から選ばれる。幾つかの実施態様においては、 $X^1$ および $X^2$ は、双方ともシリル基のようなヒドロキシ保護基である。幾つかのそのような実施態様においては、 $X^1$ および $X^2$ は、双方ともt-ブチルジメチルシリル基である。他の実施態様においては、 $X^1$ および $X^2$ は、化合物が下記に示すような式IAを有する2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモプレグナカルシフェロールであるように、双方ともHである：

【化3】



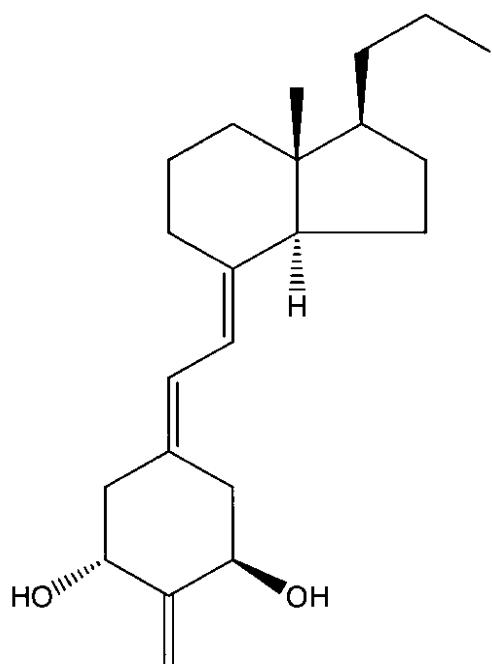
IA

10

20

幾つかのそのような実施態様においては、式IAの化合物は、式IBの化合物であり、下記に示すような構造を有する：

【化4】



IB

30

40

【0006】

上記化合物は、所望の極めて有利な生物学的活性パターンを示す。この化合物は、ビタミンDレセプターに対する比較的高い結合性に特徴を有するが、1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>と比較したときの腸カルシウム輸送活性は極めて低く、1,25-ジヒドロキシビタ

50

ミンD<sub>3</sub>と比較したときの骨からカルシウムを動員させる能力は極めて低い。従って、この化合物は、あり得たとしても僅かなカルシウム血症活性を有するものとして特性決定し得る。即ち、この化合物は、腎性骨ジストロフィーの二次性副甲状腺亢進症の抑制療法として有用であり得る。

また、本発明の化合物は、免疫系の不均衡に特徴を有するヒトの障害、例えば、多発性硬化症、狼瘡、糖尿病、宿主体移植片反応および臓器移植拒絶反応のような自己免疫疾患の治療および予防において、さらには、関節リウマチ、ぜんそくのような炎症性疾患、およびセリック病、潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患の治療においてとりわけ適している。にきび、脱毛および高血圧は、本発明の化合物によって治療し得る他の症状である。

また、上記化合物は、比較的高い細胞分化活性に特徴を有する。即ち、この化合物は、乾癬の治療用の、或いは、とりわけ白血病、結腸がん、乳がんおよび前立腺がんに対する抗がん剤としての治療薬も提供する。さらに、その比較的高い細胞分化活性に基づき、この化合物は、しわ；適切な皮膚水和 (dermal hydration) の欠如、即ち、乾燥皮膚；適切な皮膚締まり (skin firmness) の欠如、即ち、皮膚のたるみ；および不十分な皮脂分泌のような種々の皮膚症状の治療用の治療薬も提供する。この化合物の使用は、そのように、皮膚の湿潤化をもたらすだけでなく、皮膚のバリア機能も改善する。

#### 【0007】

本発明の化合物は、本発明の化合物を製薬上許容し得る担体と一緒に含む製薬調合物または医薬品を製造するのに使用し得る。そのような製薬調合物または医薬品は、本明細書において説明する障害のような種々の生物学的障害を治療するのに使用し得る。そのような障害を治療する方法は、典型的には、有効量の上記化合物、または上記化合物を含む適切量の製薬調合物または医薬品を、生物学的障害を患っている対象者に投与することを含む。幾つかの実施態様においては、対象者は、哺乳類である。幾つかのそのような実施態様においては、哺乳類は、嚙齒類、靈長類、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、クマ、ブタ、ウサギまたはモルモットから選択する。幾つかのそのような実施態様においては、哺乳類は、ラットまたはマウスである。幾つかの実施態様においては、対象者は、靈長類、例えば、幾つかの実施態様において、ヒトである。

上記化合物は、上記の疾患および障害を治療する組成物において、該組成物の約0.01 μg/gm～約1mg/gm、好ましくは該組成物の約0.1 μg/gm～約500 μg/gmの量で存在し得、約0.01 μg/日～約1mg/日、好ましくは約0.1 μg/日～約500 μg/日の投与量で、局所、経皮、経口または非経口投与し得る。

本発明のさらなる目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明および添付図面から明らかであろう。

#### 【0008】

##### (図面の簡単な説明)

図1～図7は、天然ホルモン1',25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> (各図面においては“1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>”と称する)の生物学的活性と比較した、2-メチレン-19,21-ジノル-1'-ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロール(各図面においては“19,21-ジノル”と称する)の種々の生物学的活性を示す。

図1は、[<sup>3</sup>H]-1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>と一緒の全長組換えラットビタミンDレセプターへの結合において拮抗する19,21-ジノルと1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>との相対的活性を比較したグラフである。

図2は、19,21-ジノルの濃度の関数としての%HL-60細胞分化を1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のそれと比較したグラフである。

図3は、19,21-ジノルの生体外転写活性を1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のそれと比較したグラフである。

図4は、19,21-ジノルの骨カルシウム動員活性を1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のそれと比較した棒グラフである。

図5は、19,21-ジノルの腸カルシウム輸送活性を1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のそれと比較した棒グラフである。

10

20

30

40

50

図6は、19,21-ジノルと1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の投与後の成獣ラットにおける血清カルシウムレベルを比較した棒グラフである。

図7は、19,21-ジノルと1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>との成獣ラットにおける%副甲状腺ホルモン(PTH)抑制を比較した棒グラフである。

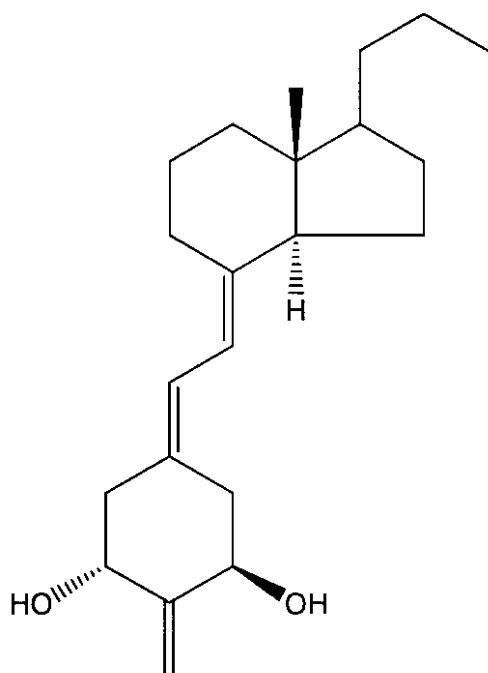
【0009】

(発明を実施するための最良の形態)

2-メチレン-19,21-ジノル-1 $\alpha$ -ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロールを合成し、試験して、本明細書において説明するような種々の生物学的症状を治療するのに有用であることを見出した。構造的には、この化合物は、下記に示すような式IAを有する：

【化5】

10



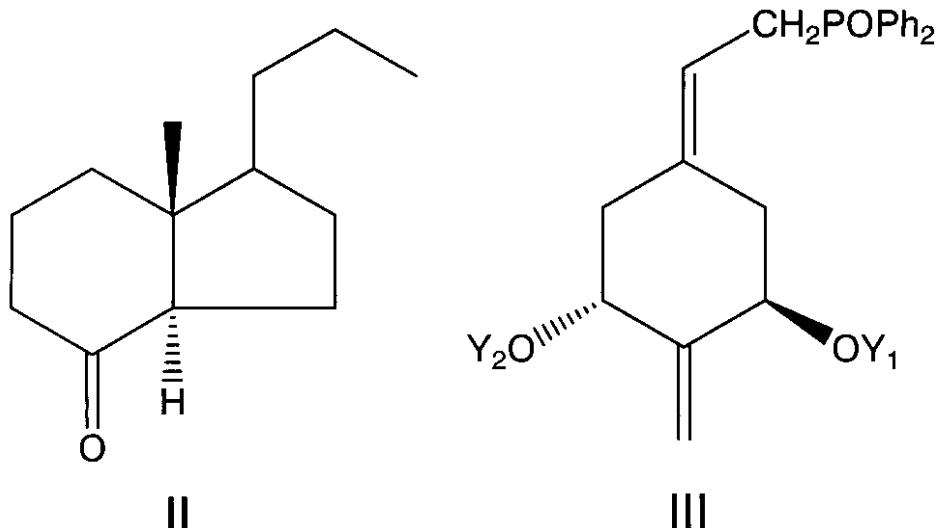
20

IA

30

2-メチレン-19,21-ジノル-1 $\alpha$ -ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロールの調製は、下記の適切な二環式ワインダウス・グルンドマン(Windaus-Grundmann)タイプのケトン(II)をアリル系ホスフィンオキサイドIIIと縮合させ、次いで脱保護する(Y<sub>1</sub>およびY<sub>2</sub>基を除去する)ことによって実施し得る：

【化6】



10

【0010】

ホスフィンオキサイドIIIにおいては、Y<sub>1</sub>およびY<sub>2</sub>は、好ましくは、シリル保護基のようなヒドロキシ保護基である。t-ブチルジメチルシリル(TBDMS)基は、とりわけ有用なヒドロキシ保護基の例である。上記の方法は、数多くのビタミンD化合物の製造に有効に応用されている収束合成概念の適用を示す(Lythgoe et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 590 (1978); Lythgoe, Chem. Soc. Rev. 9, 449 (1983); Toh et al., J. Org. Chem. 48, 1414 (1983); Baggolini et al., J. Org. Chem. 51, 3098 (1986); Sardina et al., J. Org. Chem. 51, 1264 (1986); J. Org. Chem. 51, 1269 (1986); DeLuca等の米国特許第5,086,191号; DeLuca等の米国特許第5,536,713号; および DeLuca等の米国特許第5,843,928号を参照されたい; これらの文献は、全て、その全体を参考として且つ本明細書で十分に説明するのと同様にすることを目的として本明細書に合体させる)。

20

ホスフィンオキサイドIIIは、多数の19-ノルビタミンD化合物を製造するのに使用し得る好都合な試薬であり、Sicinski et al., J. Med. Chem., 41, 4662 (1998); DeLuca等の米国特許第5,843,928号; Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991); およびDeLuca等の米国特許第5,086,191号に記載されている手法に従って製造し得る。下記の図式Iは、米国特許第5,843,928号に概略されているようなホスフィンオキサイドIIIの一般的合成手順を示す; 該米国特許は、本明細書において十分に説明するのと同様にしてその全体を本明細書に合体させる。図式Iに示す方法の修正法を使用すれば、当業者にとつては明白である多数のビタミンDアナログ類を製造することが可能である。例えば、ケトンBをアルケンCに転化するのに使用するMePh<sub>3</sub>P<sup>+</sup> Br<sup>-</sup>の代りに、多くの種類のホスホニウム化合物を使用することができる。そのような化合物の例としては、EtPh<sub>3</sub>P<sup>+</sup> Br<sup>-</sup>、PrPh<sub>3</sub>P<sup>+</sup> Br<sup>-</sup>、並びにトリフェニルホスフィンとアルキルハライド、アルケニルハライド、保護ヒドロキシアルキルハライドおよび保護ヒドロキシアルケニルハライドとの反応により一般的に製造した化合物がある。その後、この手順を使用して調製したアルケン類を、図式IにおけるホスフィンオキサイドHを調製するのに使用する方法と同様な方法で、ホスフィンオキサイドを調製するまで完遂させ得る。また、図式Iの化合物Cと同類のアルケンを(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>RhClおよびH<sub>2</sub>により還元して他のビタミンDアナログ類を調製することもできる。米国特許第5,945,410号およびSicinski, R. R. et al., J. Med. Chem., 41, 4662-4674 (1998)を参照されたい; これらの文献は、双方とも、その全体を参考としてまた全体的目的において本明細書に合体させる。従って、図式Iに示したホスフィンオキサイドの調製手順は、本発明の化合物以外の多くの種類のビタミンDアナログ類を調製するのに使用し得る。

30

40

50

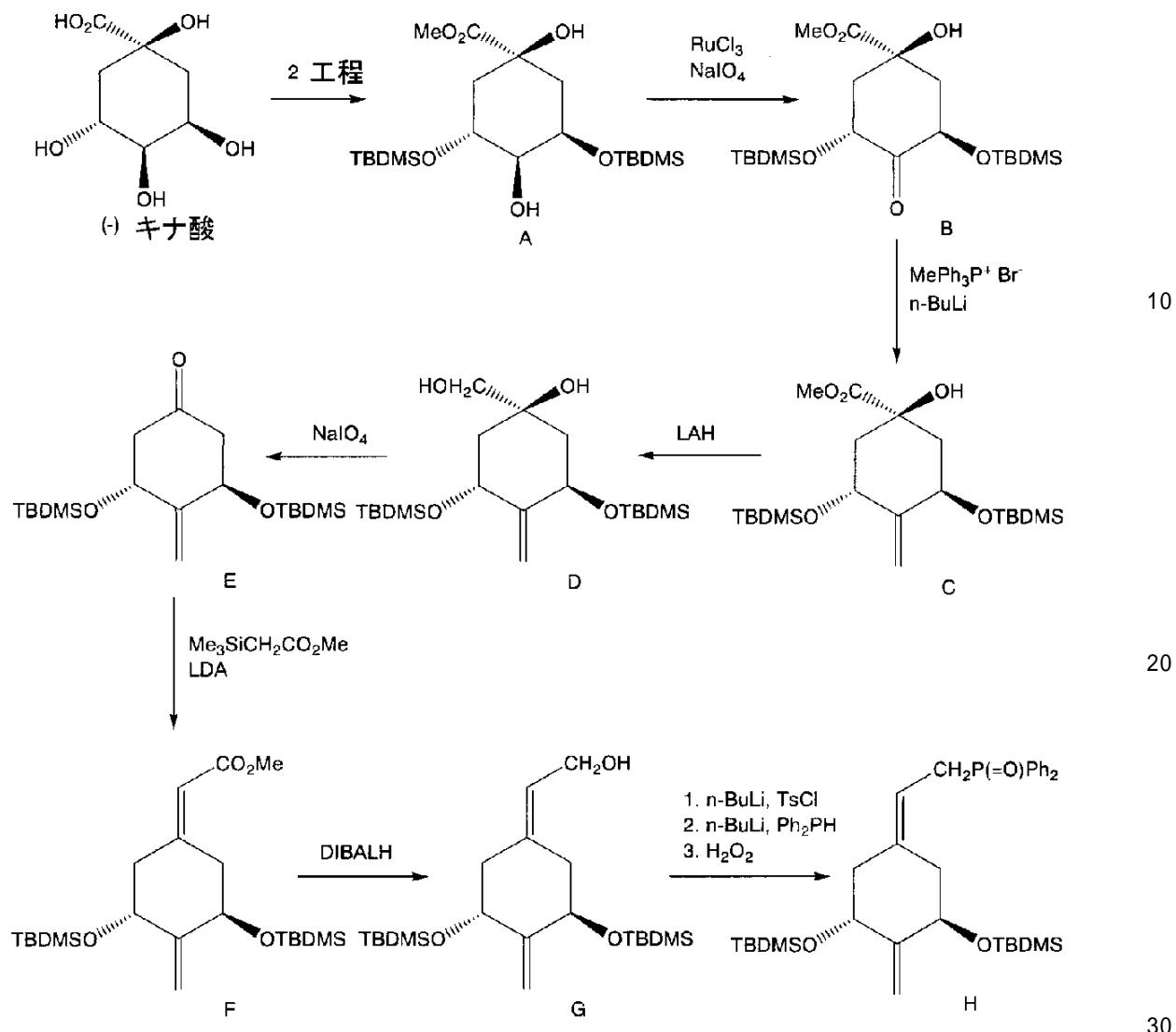
10

20

【 0 0 1 1 】

図式 I :

## 【化7】



## 【0012】

構造IIのヒドラインダノン類は、既知の方法または当業者にとって自明であり本明細書において説明するような適合化方法により調製し得る。ビタミンDアナログ類を合成するのに使用する幾つかの重要な二環式ケトン類の特定の例は、Mincione et al., *Synth. Commun.* 19, 723, (1989); およびPeterson et al., *J. Org. Chem.* 51, 1948, (1986) に記載されているケトン類である。

2-アルキリデン-19-ノル-ビタミンD化合物の全体的合成方法は、米国特許第5,843,928号に例示され、説明されている; 該米国特許は、その全体を参考として且つ本明細書で十分に説明するのと同様にすることを目的として本明細書に合体させる。

本明細書において使用するとき、用語“ヒドロキシ保護基”とは、限定するものではないが、アルコキシカルボニル、アシリル、アルキルシリルまたはアルキルアリールシリル基(以下、単純に“シリル”基と称する)、およびアルコキシアルキル基のような、ヒドロキシ(-OH)官能基の一時的保護のために一般的に使用する任意の基を意味する。アルコキシカルボニル保護基は、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、*tert*-ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニルまたはアリルオキシカルボニルのようなアルキル-O-CO-基である。用語“アシリル”は、1~6個の炭素を有し、全ての異性体形のアルカノイル基; または、オキサリル、マロニル、スクシニル、グルタリル基のような、1~6個の炭素を有するカルボキシアルカノイル基; または、ベンゾイルまたはハロ、ニトロもしくはアルキル置換ベンゾイル基のような芳香族アシリル基を意味する。アルコキシアルキ

40

50

ル保護基は、メトキシメチル、エトキシメチル、メトキシエトキシメチル、またはテトラヒドロフラニルおよびテトラヒドロピラニルのような基である。好ましいシリル保護基は、トリメチルシリル、トリエチルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル、ジブチルメチルシリル、ジフェニルメチルシリル、フェニルジメチルシリル、ジフェニル-*t*-ブチルシリルおよび同様なアルキル化シリル基である。用語“アリール”は、フェニル-、またはアルキル-、ニトロ-もしくはハロ-置換フェニル基を意味する。ヒドロキシ官能性に対する保護基の広範囲の目録は、Protective Groups in Organic Synthesis, Greene, T.W.; Wuts, P. G. M., John Wiley & Sons, New York, NY, (3rd Edition, 1999)において見出すことができる；該目録は、本明細書において説明する手法を使用して追加または削除し得、また、その全体を参考として且つ本明細書で十分に説明するのと同様にすることを目的として本明細書に合体させる。

“保護ヒドロキシ”基は、ヒドロキシ官能基の一時的または永久的保護のために一般的に使用する上記の基のいずれか、例えば、上記で定義したようなシリル、アルコキシアルキル、アシルまたはアルコキシカルボニル基によって誘導体化された即ち保護されたヒドロキシ基である。

#### 【0013】

##### (実施例)

###### 2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロールの合成

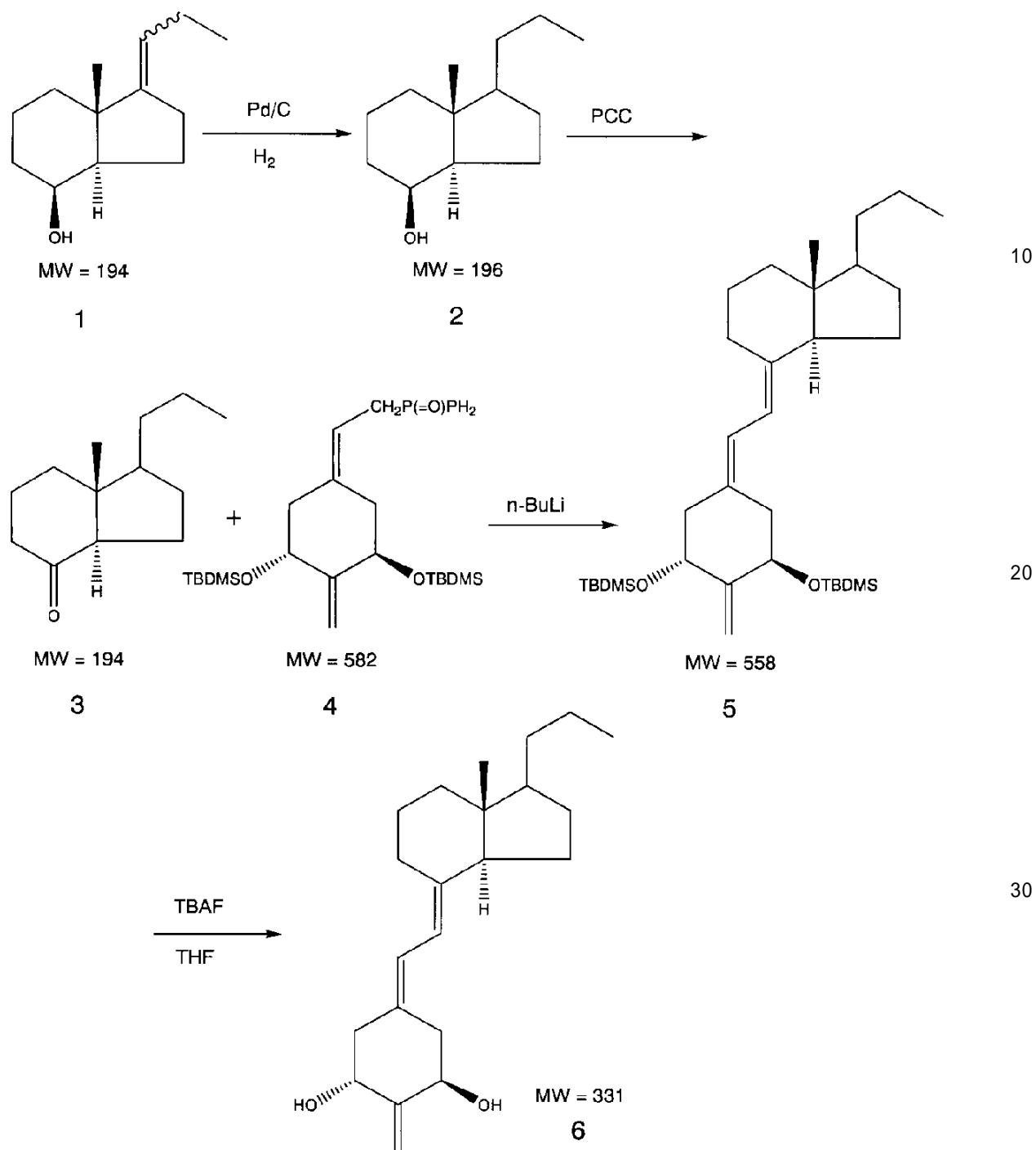
各種19-ノルビタミンDアナログ類の合成および特徴は、米国特許第5,843,928号、米国特許第6,627,622号、米国特許第6,579,861号、米国特許5,086,191号、米国特許第5,585,369号および米国特許第6,537,981号のような多くの米国特許に記載されている。上記文献の各々は、その全体を参考として且つ本明細書で十分に説明するのと同様にすることを目的として本明細書に合体させる。

式I、式IAおよび式IBの化合物を、図式IおよびIIに示す方法を使用して調製した。出発物質の化合物1を、Andrzej R. DaniewskiおよびWenLuiによって示された方法(J. Org. Chem. 66, 626-628 (2001))を使用し、該論文の図式Iの化合物7から化合物8への転化工程において $\text{Ph}_3\text{P}^+$   $\text{EtBr}^-$ の代りに $\text{Ph}_3\text{P}^+$   $\text{PrBr}^-$ を使用して調製した；該論文は、その全体を参考として且つ本明細書で十分に説明するのと同様にすることを目的として本明細書に合体させる。その後、出発物質1を、触媒としての炭素上のパラジウムを使用して水素化して、分子量196を有する飽和化合物2を得た。反応は、ヘキサン中20%酢酸エチルの溶媒系を使用しての薄層クロマトグラフィー(TLC)を使用して追跡した。その後、化合物2を、2004年11月4日に公開された米国特許公開公報第2004/0220418号(米国特許出願第10/847,040号)に記載されているようなピリジニウムクロロクロメートによって酸化して、上記と同じ溶媒系を使用するTLCによって追跡したような3を得た；該米国特許出願は、その全体を参考として且つ本明細書で十分に説明するのと同様にすることを目的として本明細書に合体させる。環Aホスフィンオキサイド化合物4を、図式Iに示すようにして合成した。縮合は、この場合も、上記の特許文献に記載されているようにして、*n*-ブチルリチウムによって実施し、ヘキサン中5%酢酸エチルの溶媒を使用するTLCにより追跡して、化合物5を得た。*t*-ブチルジメチルシリル保護基を、米国特許公開公報第2004/0220418号に記載されているようなテトラブチルアンモニウムフルオライドを使用して除去して、化合物6(2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロール)を得た。TLCを使用し、上記の溶媒系を使用して反応の拮抗を追跡した。最終生成物を、以下に示すように完全に特性決定した。

#### 【0014】

##### 図式II:

【化 8】



【0015】

2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモプレグナカルシフェロール

UV (EtOH中)  $\lambda_{\text{max}}$  244、252、262 nm;

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )、0.451 (3H, s, 18- $\text{H}_3$ )、0.898 (3H, t,  $J$  = 6.8 Hz, 23- $\text{H}_3$ )、1.8 ~ 2.05 (2H, m)、2.29 (1H, dd,  $J$  = 13.2, 8.7 Hz, 10'- $\text{H}$ )、2.33 (1H, dd,  $J$  = 13.5, 5.7 Hz, 4'- $\text{H}$ )、2.58 (1H, dd,  $J$  = 13.5, 3.8 Hz, 4''- $\text{H}$ )、ca.2.84 (1H, 10''- $\text{H}$ , 9''- $\text{H}$ により重複)、2.86 (1H, dd,  $J$  = 13.2, 4.5 Hz, 10''- $\text{H}$ )、4.49 (2H, m, 1'-および3'- $\text{H}$ )、5.10および5.11 (1Hおよび1H, 各々s,  $=\text{CH}_2$ )、5.89および6.37 (1Hおよび1H, 各々d,  $J$  = 11.4 Hz, 7'-および6'- $\text{H}$ ) ; MS (APCI)  $m/z$  (相対強度) 331 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 7)、313 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{H}_2\text{O}$ , 100)、295 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 92)。

【0016】

生物学的活性ビタミンDレセプター結合性試験材料

タンパク質源 :

全長組換えラットレセプターを大腸菌 BL21(DE3) Codon Plus RIL細胞中で発現させ、2つの異なるカラムクロマトグラフィー系を使用して等質に精製した。1番目の系は、C-末端ヒスチジンタグをこのタンパク質上で使用するニッケル親和性樹脂であった。この樹脂から溶出したタンパク質を、イオン交換クロマトグラフィー(S-Sepharose Fast Flow)を使用してさらに精製した。精製タンパク質の各アリコートを液体窒素中で急速凍結させ、使用するまで-80°で保存した。結合性アッセイにおける使用に当っては、該タンパク質を、0.1%のChaps清浄剤を含むTEDK<sub>50</sub> (50mM Tris、1.5mM EDTA、pH 7.4、5mM DTT、150mM KCl)中で希釈した。上記レセプタータンパク質およびリガンド濃度を、20%を超えない添加放射性標識リガンドが上記レセプターに結合するように最適化した。

試験薬物 :

標識化していないリガンドをエタノール中に溶解し、濃度を、UV分光測光法を使用して測定した( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  : モル吸光係数 = 18,200および $\text{max} = 265\text{nm}$  ; アナログ類 : モル吸光係数 = 42,000および $\text{max} = 252\text{nm}$ )。放射性標識化リガンド ( $^3\text{H}-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、~159 Ci/ミリモル)をエタノールに1nMの最終濃度で添加した。

アッセイ条件

放射性標識化リガンドと標識化していないリガンドを100mciの希釈タンパク質に10%の最終エタノール濃度で添加し、混合し、氷上で1夜インキュベートして結合平衡に至らせた。翌日、100mciのヒドロキシルアパタイトスラリー (50%)を各チューブに添加し、10分間隔で30分混合した。ヒドロキシルアパタイトを遠心分離により集め、その後、0.5%のTriton X-100を含有するTris-EDTA緩衝液(50mM Tris、1.5mM EDTA、pH 7.4)で3回洗浄した。最終洗浄後、ペレットを、4mlのBiosafe IIシンチレーションカクテルを含有するシンチレーションバイアルに移し、混合し、シンチレーションカウンター内に入れた。総結合性を、放射性標識化リガンドのみを含有するチューブから測定した。

## 【0017】

HL-60分化試験材料

試験薬物 :

試験薬物をエタノール中に溶解し、濃度を、UV分光測光法を使用して測定した。連続希釈物を、細胞培養物中に存在するエタノール最終濃度(0.2%)を変化させないで薬物濃度範囲を測定し得るように調製した。

細胞 :

ヒト前骨髄球性白血病(HL60)細胞を、10%のウシ胎児血清を含有するRPMI-1640培地中で増殖させた。細胞は、37°で5% CO<sub>2</sub>の存在下にインキュベートした。

アッセイ条件

HL60細胞を、 $1.2 \times 10^5$  細胞/mlで塗抹した。塗抹後18時間で、正副2通りの細胞を薬物で処理した。4日後、細胞を採取し、ニトロブルーテトラゾリウム還元アッセイを実施した(Collins et al., 1979; J. Exp. Med. 149:969-974)。分化細胞のパーセントを、総数200個の細胞を計数し、細胞内黒青色ホルマゾン付着物を含有する数を記録することによって判定した。単球細胞への分化の検証は、食作用活性を測定することによって判定した(データは示していない)。

生体外転写アッセイ

転写活性を、24-ヒドロキシラーゼ(24ohase)遺伝子プロモーターをルシフェラーゼレポーター遺伝子の上流に安定的に移入したROS 17/2.8(骨)細胞中で測定した(Arbour等、1998年)。細胞を所定の投与量範囲で投与した。投与後16時間で、細胞を採取し、ルシフェラーゼ活性を、照度計を使用して測定した。RLU = 相対ルシフェラーゼ単位。

腸カルシウム輸送および骨カルシウム動員

10

20

30

40

50

雄の離乳Sprague-Dawleyラットに、Diet 11 (0.47% Ca)給餌+AEKを1週間、次いで、Diet 11 (0.02% Ca)+AEKを3週間与えた。その後、ラットを1週間の0.47%のCaを含有する給餌に、次いで、2週間の0.02%のCaを含有する給餌に切り換えた。投与は、0.02%カルシウム給餌の最後の1週間中に開始した。4回連続のip投与を約24時間間隔で行なった。最後の投与後24時間で、血液を切断した首から採取し、血清カルシウム濃度を骨カルシウム動員の尺度として測定した。また、腸の最初の10cmも、反転腸管法を使用する腸カルシウム輸送分析用に収集した。

### 【 0 0 1 8 】

#### PTH抑制および高カルシウム血症

##### 種

10

成獣雌Sprague-Dawleyラットは、Harlan社(ウィスコンシン州マジソン)から入手した。

##### 動物飼育

受入時に、各動物を個々の尾部マークにより特定した。動物は、吊り下げたステンレススチールワイヤー底ゲージ内に囲った。ゲージ毎に1匹の動物を収容した。動物室は、20~22.2 (68~72 °F)の温度および25~75%の相対湿度に維持した。各保持室は、1日当たり12時間の照明を与えるようにセットした。飲水並びに0.47%と0.3%のリンおよび脂溶性ビタミンA、D、EおよびKを含有する精製齧歯類飼料(Suda等、Purified Rodent Diet-Diet 11)は、自由に与えた。

##### 処理群

20

動物を、処理群(5匹動物/群)に無作為に振分けた。全ての投与を100マイクロリットルのプロピレングリコール中で腹腔内投与にて行なった。4~7回の連続投与をおよそ24時間間隔で行なった。投与は、動物を少なくとも1週間順応させた後に開始した。

##### 投与調合物

##### 対照材料

##### A. 陰性対照材料

陰性対照材料は、エタノール(< 5%)およびプロピレングリコールを容量分析的に計量し、混合し、その後、2~8 で保存することによって調製した。

##### B. 陽性対照材料

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を、UV分光測光法(吸光係数 = 18,200 ; <sub>max</sub> = 265nm)を使用するエタノール原溶液の濃度を決定することによって調製した。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の必要量は、最終溶液中に5%未満のエタノールが存在するように容量分析的にプロピレングリコール中に計量した。溶液を混合し、その後、2~8 で保存した。

30

##### 試験材料

アナログ類を、UV分光測光法(吸光係数 = 42,000 ; <sub>max</sub> = 252nm)を使用するエタノール原溶液の濃度を先ず決定することによって調製した。その後、アナログ溶液を、最終溶液中に5%未満のエタノールが存在するように容量分析的にプロピレングリコール中に添加した。溶液を混合し、2~8 で保存した。

##### 投与方法

両対照品および試験品を、100マイクロリットル中での腹腔内注射により、およそ24時間の間隔を置いて4~7日間連続投与した。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は、4日間連続で投与し、一方、試験薬物は、7日間連続で投与した。

40

##### 血清PTHレベル

最終投与後24時間で、血液を尾部動脈から採取し、生物活性血清PTH濃度を、Immutopic社(カリフォルニア州サンクレメンテ)からのラットBioActive Intact PTH ELISA Kitを使用して測定した。

### 【 0 0 1 9 】

#### 血清カルシウム分析

最終投与後24時間で、約1mlの血液を、各実験動物の尾部動脈から採取した。血液を室温で凝集せしめ、次いで、3000 × gで15分間遠心分離した。血清をポリプロピレンチューブに移し、-20 で冷凍保存した。カルシウムレベルを、血清を0.1%塩化ランタン中に希

50

釀し、吸光度を原子吸光分光光度計(Perkin Elmer Model 3110 ; Shelton社(コネチカット州))で測定することによって測定した。

2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモプレグナカルシフェロールは、上記組換えビタミンDレセプターに結合するが、この点においては、1<sub>1</sub>,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>よりも約5倍活性が低い(図1参照)。さらにまた、2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモプレグナカルシフェロールは、Ros 17/2.8(骨)細胞中に安定的に移入したレポーター遺伝子の転写刺激において活性であり、有意の生物学的活性を示している(図3参照)。しかしながら、2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモプレグナカルシフェロールは、HL-60細胞の分化誘発においては1<sub>1</sub>,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>よりも約15倍活性が低い(図2参照)。2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモプレグナカルシフェロールは、腸カルシウム輸送または骨カルシウム動員のいずれで測定したときも、

1<sub>1</sub>,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の投与量の100倍で投与したときでさえもカルシウム血症活性を有していない(図4および5参照)。しかしながら、2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモプレグナカルシフェロールは、正常ラットにおける副甲状腺ホルモンレベルの抑制においては有意の活性を有している(図7参照)。この化合物は、多発性硬化症、1型糖尿病、関節リウマチ、狼瘡のような自己免疫疾患、および他の同様な変性疾患の治療においてその用途を見出すであろう。また、この化合物は、結腸直腸がん、乳がんおよび前立腺がんのような悪性物増殖の治療において有意に活性であろう。これらの活性は、全て、血清カルシウム濃度の上昇のないことで明白であろう(図6参照)。また、この化合物は、血液透析または腹膜透析患者のような腎機能を喪失している患者において見出される二次副甲状腺機能亢進症の治療においても有用であろう。

#### 【0020】

また、本発明の化合物は、肥満の予防または治療、脂肪細胞分化の抑制、SCD-1遺伝子転写の抑制、および/または動物対象者における体脂肪の低減においても有用である。従つて、幾つかの実施態様においては、肥満を予防または治療する、脂肪細胞分化を抑制する、SCD-1遺伝子転写を抑制する、および/または動物対象者における体脂肪を低減する方法は、動物対象者に、有効量の上記化合物または上記化合物を含む製薬組成物を投与することを含む。対象者への上記化合物または製薬組成物の投与は、脂肪細胞分化を抑制し、遺伝子転写を抑制し、および/または動物対象者における体脂肪を低減する。

#### 【0021】

治療目的においては、式I、式IAおよび式IBによって定義した化合物は、当該技術における既知の通常の方法に従い、無毒溶媒中の溶液として、適切な溶媒または担体中のエマルジョン、懸濁液または分散液として、或いは固形担体と一緒にピル剤、錠剤またはカプセル剤として、薬物用途のために調合し得る。そのような製剤は、いずれも、他の製薬上許容し得且つ無毒性の賦形剤、例えば、安定剤、酸化防止剤、バインダー類、着色剤、または乳化剤または風味改良剤も含有し得る。製薬上許容し得る賦形剤および担体は、当業者にとって一般的に知られており、そのようにして、本発明に含ませる。そのような賦形剤および担体は、例えば、“Remingtons Pharmaceutical Sciences” Mack Pub. Co., New Jersey (1991) に記載されている；該文献は、その全体を参考として且つ本明細書で十分に説明するのと同様にすることを目的として本明細書に合体させる。

上記化合物は、経口、局所、非経口または経皮投与し得る。上記化合物は、有利には、適切な滅菌溶液の注入または静脈内輸注により、或いは消化管を介しての液体または固形投与量剤形で、或いはクリーム、軟膏、パッチまたは経皮投与に適する同様なビヒクルの形で投与する。幾つかの実施態様においては、上記化合物の0.001 μg～約1mg/日の投与量が、治療目的において適切である。幾つかのそのような実施態様においては、適切且つ有効な投与量は、上記化合物の0.01 μg～1mg/日の範囲であり得る。他のそのような実施態様においては、適切且つ有効な投与量は、上記化合物の0.1 μg～500 μg/日の範囲であり得る。そのような投与量は、当該技術において周知であるように、治療すべき疾患または症状のタイプ、疾患または症状の重篤度、および対象者の応答性に応じて調整されるであろ

10

20

30

40

50

う。上記化合物は、単独でまたは他の活性ビタミンD化合物と一緒に適切に投与し得る。

【0022】

本発明において使用する組成物は、有効量の活性成分としての2-メチレン-19,21-ジノル-1-ヒドロキシ-ビスホモブレグナカルシフェロールおよび適切な担体を含む。本発明の幾つかの実施態様に従って使用する上記化合物の有効量は、一般に、本明細書において上記した量のような投与量であり、局所、経皮、経口、経鼻、経直腸または非経口投与し得る。

式IAおよび式IBの化合物は、有利には、前骨髄球の正常マクロファージへの分化を達成するのに十分な量で投与し得る。上述したような投与量が適しており、上記投与量は、当該技術において周知であるように、疾患の重篤度並びに対象者の状態および応答性に応じて調整すべきであることを理解されたい。 10

上記化合物は、クリーム、ローション、軟膏、エアゾール、座薬、局所用パッチ、ピル剤、カプセル剤または錠剤として、或いは製薬上無毒で且つ許容し得る溶媒またはオイル中の溶液、エマルジョン、分散液または懸濁液のような液状剤形に調合し得、そのような製剤は、さらに、他の製薬上無毒で且つ有益な成分、例えば、安定剤、酸化防止剤、乳化剤、着色剤、バインダー類または風味改良剤も含有し得る。

本発明の製剤は、活性成分を、製薬上許容し得る担体および任意成分としての他の治療用成分と一緒に含む。担体は、製剤の他の成分と適合性であり且つその受容者に対して有害でないという意味において“許容し得る”ものでなければならない。 20

【0023】

経口投与に適する本発明の製剤は、カプセル剤、小包装剤(sachet)、錠剤またはトローチ剤のような個々の単位の剤形(各々が所定量の活性成分を含有する)；粉末または顆粒剤形；水性液体または非水性液体中の溶液または懸濁液剤形；或いは水中油エマルジョンまたは油中水エマルジョン剤形であり得る。

直腸投与用の製剤は、活性成分とココアバターのような担体とを混入した座薬剤形、またはかん腸剤形であり得る。

非経口投与に適する製剤は、好都合には、好ましくは受容者の血液と等張性である上記活性成分の滅菌油性または水性調合物を含む。

局所投与に適する製剤は、塗布薬、ローション、アプリカント(applicant)類；クリーム、軟膏またはペーストのような水中油または油中水エマルジョン；或いは点滴剤またはスプレー剤のような溶液または懸濁液のような液状または半液状調合物を含む。 30

経鼻投与においては、粉末吸入；スプレー缶、ネブライザーまたはアトマイザーによって分配される自己推進またはスプレー製剤を使用し得る。各製剤は、分配するとき、好ましくは、10～100ミクロンの範囲の粒度を有する。

上記各製剤は、好都合には、投与量単位剤形で提供し得、製薬技術において周知の任意の方法によって調製し得る。用語“投与量単位”とは、そのような活性成分またはその固形または液体の製薬用希釈剤または担体との混合物のいずれかを含む物理的にまた化学的に安定な単位投与量として患者に投与し得る単一の、即ち、単回投与量を意味する。

【0024】

本明細書において引用した全ての文献は、その全体を参考として且つ本明細書で十分に説明するのと同様にすることを目的として本明細書に合体させる。 40

本発明は、本明細書において例示として説明した実施態様に限定されるものではなく、特許請求の範囲に属するそのような全ての態様を包含するものと理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】 $[^3\text{H}]-1,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ と一緒の全長組換えラットビタミンDレセプターへの結合において拮抗する19,21-ジノルと $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ との相対的活性を比較したグラフである。

【図2】19,21-ジノルの濃度の関数としての%HL-60細胞分化を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のそれと比較したグラフである。

【図3】19,21-ジノルの生体外転写活性を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のそれと比較したグラフである。 50

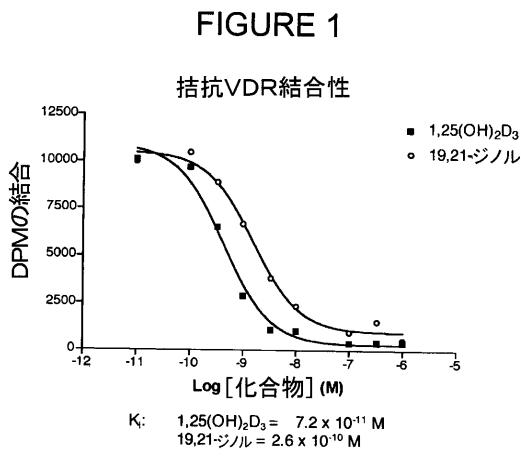
【図4】19,21-ジノルの骨カルシウム動員活性を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のそれと比較した棒グラフである。

【図5】19,21-ジノルの腸カルシウム輸送活性を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のそれと比較した棒グラフである。

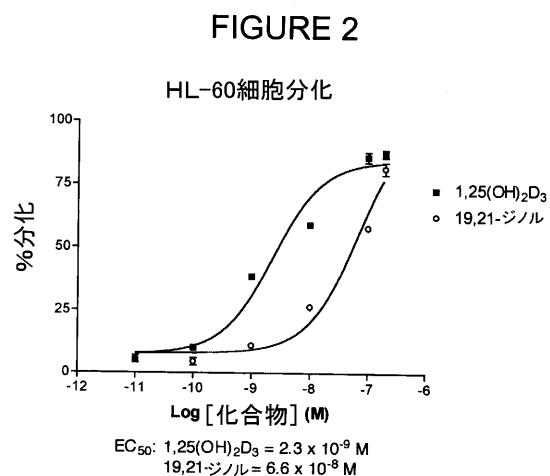
【図6】19,21-ジノルと $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与後の成獣ラットにおける血清カルシウムレベルを比較した棒グラフである。

【図7】19,21-ジノルと $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ との成獣ラットにおける%副甲状腺ホルモン(PTH)抑制を比較した棒グラフである。

【図1】

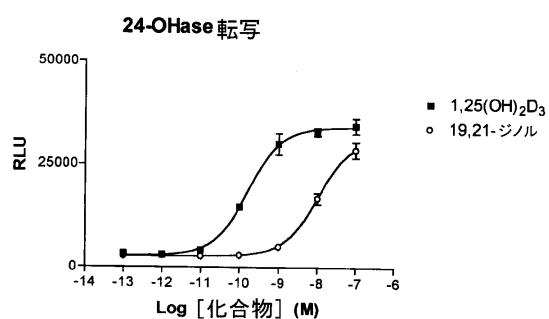


【図2】



【図3】

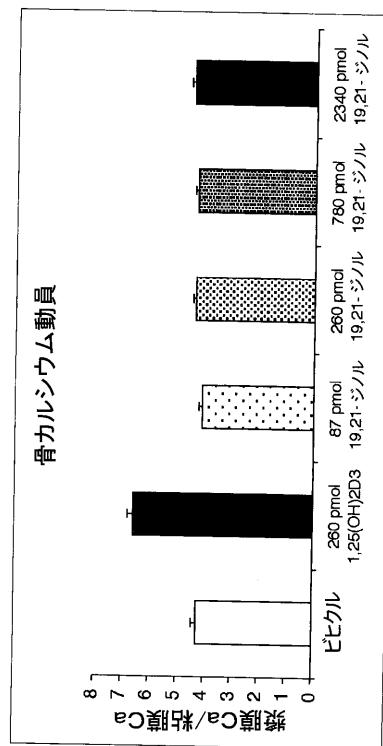
FIGURE 3



EC<sub>50</sub>: 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> =  $1.7 \times 10^{-10}$  M  
19,21-ジノル =  $1.0 \times 10^{-8}$  M

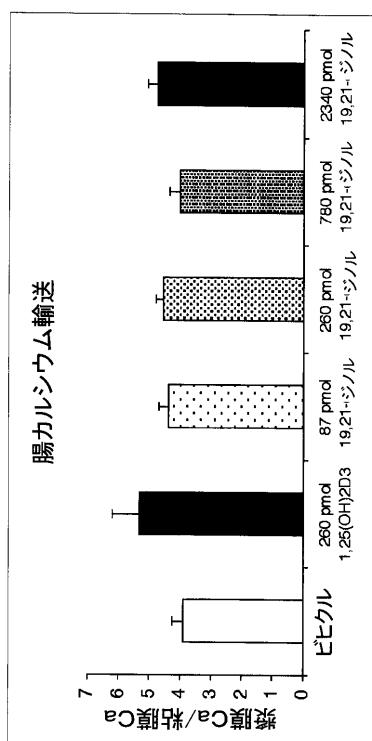
【図4】

FIGURE 4



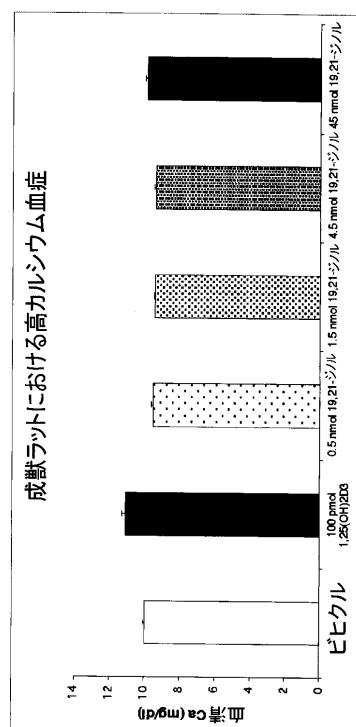
【図5】

FIGURE 5



【図6】

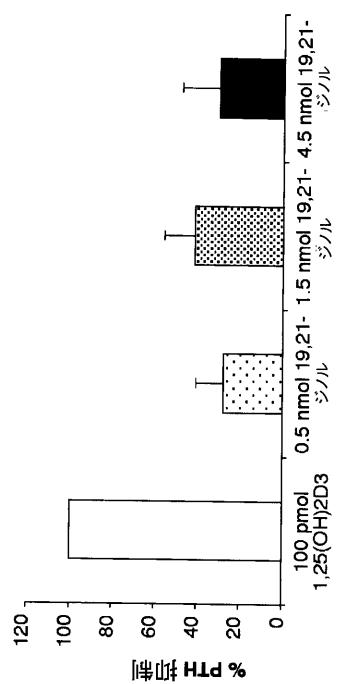
FIGURE 6



【図7】

FIGURE 7

成獣ラットにおけるPTH抑制



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	35/00	(2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	37/00	(2006.01) A 6 1 P 37/00
A 6 1 P	25/28	(2006.01) A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	17/00	(2006.01) A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	3/10	(2006.01) A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	37/06	(2006.01) A 6 1 P 37/06
A 6 1 P	29/00	(2006.01) A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	11/06	(2006.01) A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	1/04	(2006.01) A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	17/16	(2006.01) A 6 1 P 17/16
A 6 1 P	19/10	(2006.01) A 6 1 P 19/10
A 6 1 P	21/04	(2006.01) A 6 1 P 21/04
A 6 1 P	43/00	(2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 デルーカ ヘクター エフ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53531 ディアフィールド ハイウェイ ビービー 1  
809

(72)発明者 プラム ロリー エイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53503 アレナ ハイウェイ エイチ 6139

(72)発明者 クラゲット デイム マーガレット

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53531 ディアフィールド ハイウェイ ビービー 1  
809

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 国際公開第2003/075932 (WO, A1)

国際公開第2003/051828 (WO, A2)

国際公開第2002/020021 (WO, A1)

特表2001-504135 (JP, A)

特表2007-512376 (JP, A)

Proceedings of the National Academy of Science, 2004年, Vol.101, No.18, p.6900-6904

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C 401/00

CA/REGISTRY(STN)