

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5036566号
(P5036566)

(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
A61K 31/592	(2006.01)	A 61 K 31/592	
A61P 1/04	(2006.01)	A 61 P 1/04	
A61P 1/00	(2006.01)	A 61 P 1/00	
A61P 3/10	(2006.01)	A 61 P 3/10	

請求項の数 10 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-555236 (P2007-555236)
 (86) (22) 出願日 平成18年2月10日 (2006.2.10)
 (65) 公表番号 特表2008-530110 (P2008-530110A)
 (43) 公表日 平成20年8月7日 (2008.8.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2006/004699
 (87) 國際公開番号 WO2006/086613
 (87) 國際公開日 平成18年8月17日 (2006.8.17)
 審査請求日 平成21年1月16日 (2009.1.16)
 (31) 優先権主張番号 60/652,473
 (32) 優先日 平成17年2月11日 (2005.2.11)
 (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

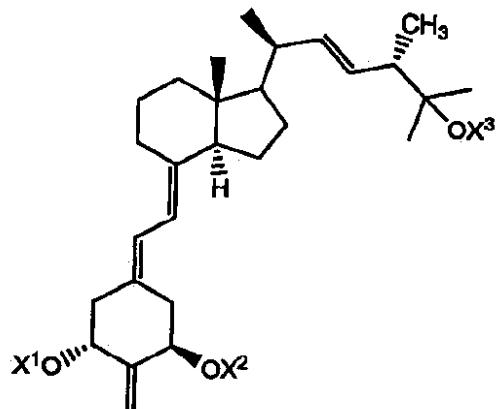
(54) 【発明の名称】 2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D2

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式1を有する化合物。

【化1】



10

(式中、X¹、X²及びX³は、H及びヒドロキシ保護基から独立に選択される。)

【請求項2】

X¹とX²が両方ともヒドロキシ保護基である、請求項1に記載の化合物。

20

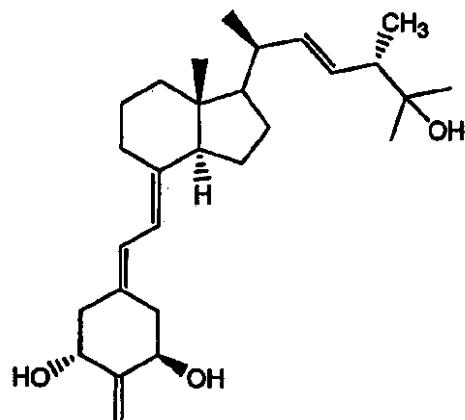
【請求項 3】

X^1 と X^2 が両方ともt-ブチルジメチルシリル基である、請求項2に記載の化合物。

【請求項 4】

X^1 、 X^2 、及び X^3 がすべてHであり、かつ該化合物が下記式IAを有する、請求項1に記載の化合物。

【化2】



IA

10

20

【請求項 5】

有効量の請求項4に記載の化合物と、医薬的に許容しうる担体とを含む医薬組成物。

【請求項 6】

前記有効量が、該組成物1g当たり0.01 μg～1mgの前記化合物を含む、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記有効量が、該組成物1g当たり0.1 μg～500 μgの前記化合物を含む、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

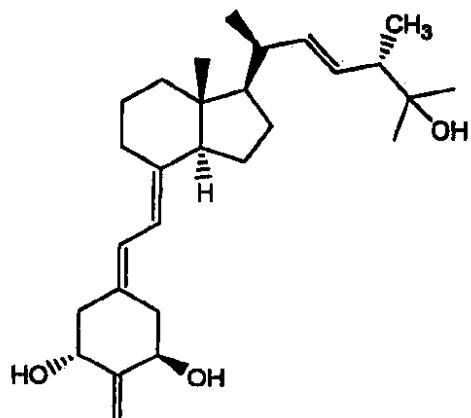
有効量の請求項4に記載の化合物を含む生物学的状態に苦しむ対象を治療するための医薬組成物であつて、前記生物学的状態が、乾癬；白血病；大腸癌；乳癌；前立腺癌；多発性硬化症；ループス；糖尿病；宿主対移植片反応；臓器移植の拒絶反応；リウマチ性関節炎、喘息、又は炎症性腸疾患から選択される炎症性疾患；しわ、十分な皮膚の堅固さの欠如、十分な皮膚の水分補給の欠如、又は不十分な皮脂分泌から選択される皮膚状態；腎性骨異常症；又は骨粗しょう症から選択される医薬組成物。

30

【請求項 9】

X^1 、 X^2 、及び X^3 がすべてHであり、かつ該化合物が下記式IBを有する、請求項1に記載の化合物。

【化3】



10

IB

【請求項10】

請求項4又は請求項9に記載の化合物の、乾癬；白血病；大腸癌；乳癌；前立腺癌；多発性硬化症；ループス；糖尿病；宿主対移植片反応；臓器移植の拒絶反応；リウマチ性関節炎、喘息、又は炎症性腸疾患から選択される炎症性疾患；しわ、十分な皮膚の堅固さの欠如、十分な皮膚の水分補給の欠如、又は不十分な皮脂分泌から選択される皮膚状態；腎性骨異常症；又は骨粗しょう症から選択される生物学的状態の治療用薬物の調製における使用。

20

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

この出願は、ビタミンD化合物、さらに詳しくは2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₂及びこの化合物を含む医薬製剤に関する。本発明は、2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₂又はその塩の、種々の疾患を治療するために使う薬物の調製における使用にも関する。

30

【0002】

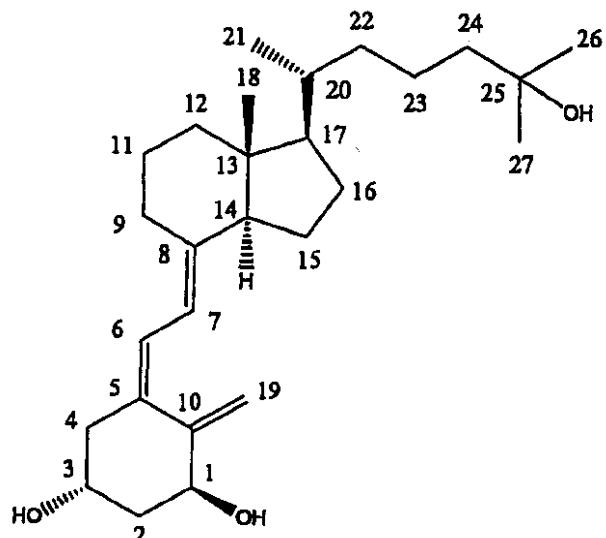
【発明の背景】

天然のホルモンである1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (1₁,25-ジヒドロキシコレカルシフェロール及カルシトリオールとも呼ばれる) 及びエルゴステロール系列のその類似体、すなわち1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₂は、動物及びヒトにおけるカルシウムホメオスタシスの非常に強力なレギュレーターであることが分かっており、その細胞分化における活性も確立されている (Ostrem et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2610 (1987))。これら代謝物の多くの構造類似体、例えば1₁-ヒドロキシビタミンD₃、1₁-ヒドロキシビタミンD₂、種々の側鎖相同ビタミン、及びフッ素化類似体が調製かつ試験されている。これら化合物には、細胞の分化とカルシウムの調節において活性の興味深い区分けを示すものがある。この活性の差異は、腎性骨異常症、ビタミンD-耐性くる病、骨粗しょう症、乾癬、及び特定の悪性腫瘍のような種々の疾患の治療で役立つ。1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₃の構造及びこの化合物中の炭素原子を示すために使用するナンバリングシステムを以下に示す。

40

【0003】

【化1】



10

1,25-ジヒドロキシビタミンD₃ = 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

【0004】

別分類のビタミンD類似体、すなわち、いわゆる19-ノル-ビタミンD化合物は、ビタミンD系の典型であるA-環の環外メチレン基（炭素19）の2個の水素原子による置換によって特徴づけられる。該19-ノル-類似体（例えば1,25-ジヒドロキシ-19-ノル-ビタミンD₃）の生物学的試験は、細胞分化の誘発における高い作用強度の選択的活性プロフィールと非常に低いカルシウム動員活性を明らかにした。従って、これら化合物は、悪性腫瘍の治療、又は種々の皮膚障害の治療のための治療薬として役立つ可能性がある。このような19-ノル-ビタミンD類似体の2つの異なる合成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), 及びDeLuca et al., 米国特許第5,086,191号）。

米国特許第4,666,634号明細書では、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃の2-ヒドロキシ及びアルコキシ（例えばED-71）類似体がChugaiグループによって開示され、骨粗しょう症の強力な薬物として、及び抗腫瘍薬として検査された。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D₃の他の2-置換（ヒドロキシアルキルを有する、例えばED-120、及びフルオロアルキル基を有する）A-環類似体も調製かつ試験されている（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), 及びJ. Org. Chem. 60, 4617 (1995)）。

1,25-ジヒドロキシ-19-ノル-ビタミンD₃の様々な2-置換類似体、すなわち2-位にてヒドロキシ又はアルコキシ基（DeLuca et al., 米国特許第5,536,713号）、2-アルキル基（DeLuca et al., 米国特許第5,945,410号）、及び2-アルキリデン基（DeLuca et al., 米国特許第5,843,928号）で置換されている化合物も合成されており、これら類似体は興味深く、選択的な活性プロフィールを示す。すべてのこれらの研究は、ビタミンD受容体中の結合部位が、合成されたビタミンD類似体中のC-2に異なる置換基を収容できることを示している。

【0005】

19-ノル分類の薬理学的に重要なビタミンD化合物を探索するための継続的な努力において、炭素2(C-2)にメチレン置換基、炭素1(C-1)にヒドロキシル基、及び炭素20(C-20)に結合した短縮側鎖が存在することを特徴とする類似体も合成かつ試験されている。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号明細書に記載され、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号明細書に記載され、1-ヒドロキシ-2-メチレン-19-ノル

20

30

40

50

-ビスホモプレゲナカルシフェロールは米国特許第6,627,622号明細書に記載されている。これら3つの化合物はすべてビタミンD受容体に対して相対的に高い結合活性と相対的に高い細胞分化活性を有するが、血漿カルシウム上昇活性は1_{1,25}-ジヒドロキシビタミンD₃に比べて小さい。この生物学的活性が、前記'352、'861及び'622特許で述べられているように、これら化合物を種々の医薬用途のための優秀な候補にする。

【 0 0 0 6 】

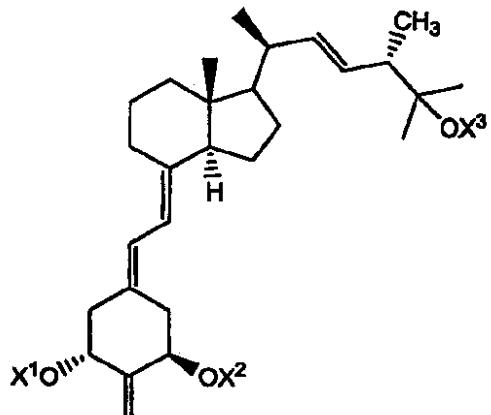
〔発明の概要〕

本発明は、2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₂と関連化合物、2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₂を含む医薬製剤、及びこの化合物の、種々の疾患状態の治療で使う薬物の調製における使用を提供する。

従って、一局面では、本発明は、以下に示される式Iを有する化合物を提供する。

【 0 0 0 7 】

【化 2】



10

20

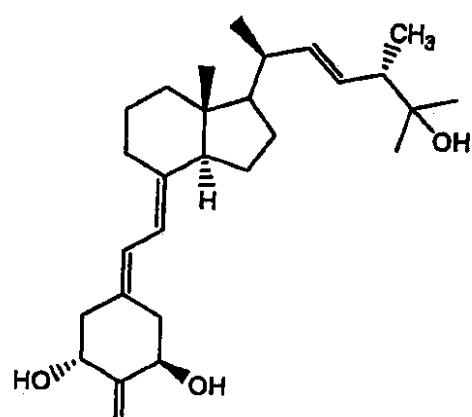
〔 0 0 0 8 〕

(式中、 X^1 、 X^2 、及び X^3 は同一又は異なってよく、H又はヒドロキシ保護基から独立に選択される。)いくつの実施態様では、 X^1 と X^2 が両方ともヒドロキシ保護基、例えばシリル基である。このようないくつかの実施態様では、 X^1 と X^2 が両方ともt-ブチルジメチルシリル基である。他の実施態様では、 X^1 、 X^2 、及び X^3 がすべてHであり、化合物は以下に示される式IAを有する2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1,25-ジヒドロキシビタミンD₂である

30

[0 0 0 9 1]

【化 3】



40

1A

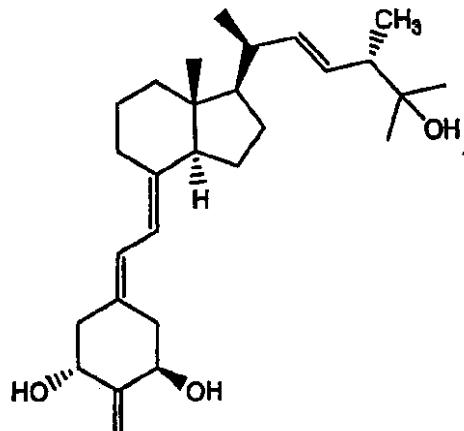
[0 0 1 0]

50

このようないくつかの実施態様では、式IAの化合物が式IBの化合物であり、以下に示される構造を有する。

【0011】

【化4】



10

IB

【0012】

上記化合物は、望ましく、かつ非常に有益なパターンの生物活性を示す。この化合物は、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃の結合性に比べて相対的に高いビタミンD受容体に対する結合性と、同様の腸のカルシウム輸送活性によって特徴づけられる。上記化合物は、骨からカルシウムを動員するその能力において1,25-ジヒドロキシビタミンD₃に匹敵する。それゆえに、この化合物をいくらかの血漿カルシウム上昇活性を有すると特徴づけることができる。従って、この化合物は、腎性骨異常症の続発性副甲状腺機能亢進症の抑制のため、及び骨粗しょう症のような他のカルシウムの不均衡障害の治療のための療法として有用だろう。

本発明の化合物は、特に免疫系の不均衡によって特徴づけられるヒトの障害、例えば多発性硬化症、ループス、糖尿病、宿主対移植片反応、及び臓器移植の拒絶反応といった自己免疫性疾患の治療及び予防；さらに炎症性疾患、例えばリウマチ性関節炎、喘息、及び炎症性大腸疾患、例えば腹腔疾患、潰瘍性結腸炎及びクローン病の治療にも適合する。にきび、脱毛症及び高血圧症は、本発明の化合物で治療しうる他の状態である。

上記化合物は、相対的に高い細胞分化活性によっても特徴づけられる。従って、この化合物は、乾癬の治療のための治療薬をも提供し、或いは特に白血病、大腸癌、乳癌及び前立腺癌に対する抗癌薬として提供される。さらに、その相対的に高い細胞分化活性のため、この化合物は、しわ、十分な皮膚の水分補給の欠如、すなわち乾燥皮膚、十分な皮膚の堅固さの欠如、すなわち皮膚のたるみ、及び不十分な皮脂分泌といった種々の皮膚状態の治療のための治療薬を提供する。従って、この化合物を使用すると、皮膚に潤いを与えることとなるのみならず、皮膚のバリア機能をも改善する。

【0013】

本発明の化合物を用いて、本発明の化合物を医薬的に許容しうる担体と組み合わせて含む医薬製剤又は薬物を調製することができる。このような医薬製剤及び薬物を用いて本明細書で述べるような生物学的障害を治療することができる。このような障害の治疗方法は、典型的に、有効量の本化合物又は本化合物を含む適量の医薬製剤若しくは薬物を、前記生物学的障害に苦しむ対象に投与することを含む。いくつかの実施態様では、対象は哺乳動物である。このようないくつかの実施態様では、哺乳動物はげっし類、靈長類、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、クマ、ブタ、ウサギ、又はモルモットから選択される。いくつかのこのような実施態様では、哺乳動物はラット又はマウスである。いくつかの実施態様では、対象は靈長類であり、例えば、いくつかの実施態様ではヒトである。

本化合物は、上記疾患及び障害を治療するための組成物中に、該組成物1g当たり約0.01

20

30

40

50

μg～約1mg、好ましくは約0.1μg～約500μgの量で存在しうる。また約0.01μg/日～約1mg/日、好ましくは約0.1μg/日～約500μg/日の薬用量で局所、経皮、経口、又は非経口投与することができる。

本発明のさらなる目的、特徴及び利点は、以下の詳細な説明と図面から明らかだろう。

図1～5は、天然ホルモン1,25-ジヒドロキシビタミンD₃（図中“1,25-(OH)₂-D₃”と表される）の種々の生物活性と比較した2-メチレン-19-ノル(20S-24S)-1,25-ジヒドロキシビタミンD₂（図中“(20S/24S)2-MD₂”と表される）の種々の生物活性を示す。

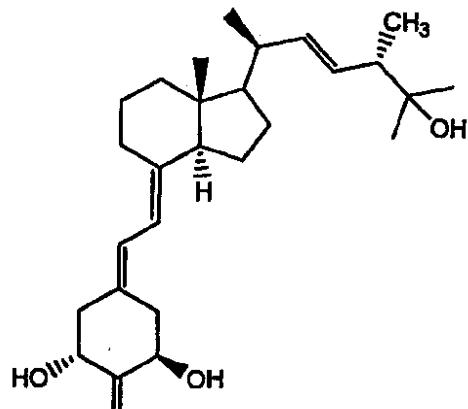
【0014】

〔発明の詳細な説明〕

2-メチレン-19-ノル(20S-24S)-1,25-ジヒドロキシビタミンD₂を合成し、試験すると、本明細書で述べた種々の生物学的状態の治療に有用であることが分かった。構造的に、この化合物は以下に示される式IAを有する。

【0015】

【化5】



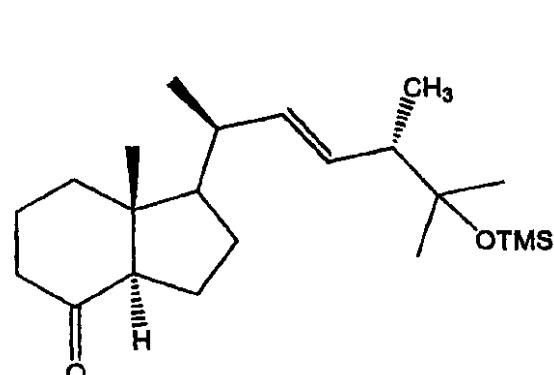
IA

【0016】

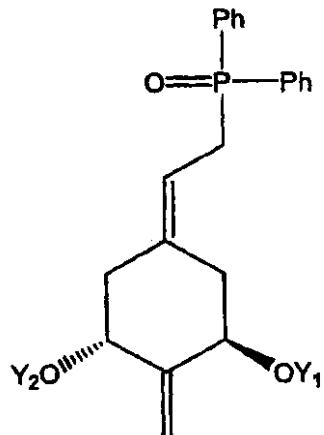
適切な二環式Windaus-Grundmann型ケトン(II)とアリルホスフィンオキシドIIIの縮合後、脱保護(Y₁及びY₂基の除去)によって、2-メチレン-19-ノル(20S-24S)-1,25-ジヒドロキシビタミンD₂の調製を達成できる。

【0017】

【化6】



II



III

【0018】

10

20

30

40

50

ホスフィンオキシドIII中、Y₁及びY₂は、好ましくはヒドロキシ-保護基、例えばシリル保護基である。t-ブチルジメチルシリル(TBDMS)基は、特に有用なヒドロキシ-保護基の例である。上述した方法は、いくつかのビタミンDの調製に有効に適用されている近似の合成概念の応用を表す (Lythgoe et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 590 (1978); Lythgoe et al., Chem. Soc. Rev. 9, 449 (1983); Toh et al., J. Org. Chem. 48, 1414 (1983); Baggioolini et al., J. Org. Chem. 51, 3098 (1986); Sardina et al., J. Org. Chem. 51, 1264 (1986); J. Org. Chem. 51, 1269 (1986); DeLuca et al., 米国特許第5,086,191号明細書; DeLuca et al., 米国特許第5,536,713号明細書; 及びDeLuca et al., 米国特許第5,843,928号明細書を参照されたい。これらはすべて参照によってその全体がすべての目的のため本明細書で完全に述べたかのように本明細書に組み込まれる)。 10

【0019】

ホスフィンオキシドIIIは、多数の19-ノルビタミンD化合物を調製するために使用できる便利な試薬であり、Sicinski et al., J. Med. Chem., 41, 4662 (1998), DeLuca et al., 米国特許第5,843,928号明細書; Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991); 及びDeLuca et al., 米国特許第5,086,191号明細書に記載されている手順に従って調製される。スキームIは米国特許第5,843,928号明細書(参照によってその全体が本明細書で完全に述べたかのように本明細書に組み込まれる)に概要が述べられている通りのホスフィンオキシドIIIを合成するための一般手順を示す。当業者には明らかなように、スキームIに示される方法の変形を用いて、多数のビタミンD類似体を製造できる。例えば、ケトンBをアルケンCに変換するために使用するMePh₃P⁺Br⁻の代わりに種々多様のホスホニウム化合物を使用できる。このような化合物の例として、EtPh₃P⁺Br⁻、PrPh₃P⁺Br⁻、及び一般的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、保護されたヒドロキシアルキルハライド、及び保護されたヒドロキシアルケニルハライドの反応で調製される化合物が挙げられる。そして、この手順を用いて調製したアルケンを、スキームIでホスフィンオキシドHを調製するために用いる方法と同様の方法で完成させてホスフィンオキシドを調製することができる。或いは、スキームIの化合物Cに類似したアルケンを(Ph₃P)₃RhClとH₂で還元して他のビタミンD類似体を与える。米国特許第5,945,410号明細書及びSicinck, R. R. et al., J. Med. Chem., 41, 4662-4674 (1998)を参照されたい(両方とも参照によってその全体がすべての目的のため本明細書に組み込まれる)。従って、スキームIに示されるホスフィンオキシドを形成する手順を用いて、本発明の化合物に加え、種々多様のビタミンD類似体を調製することができる。 20

【0020】

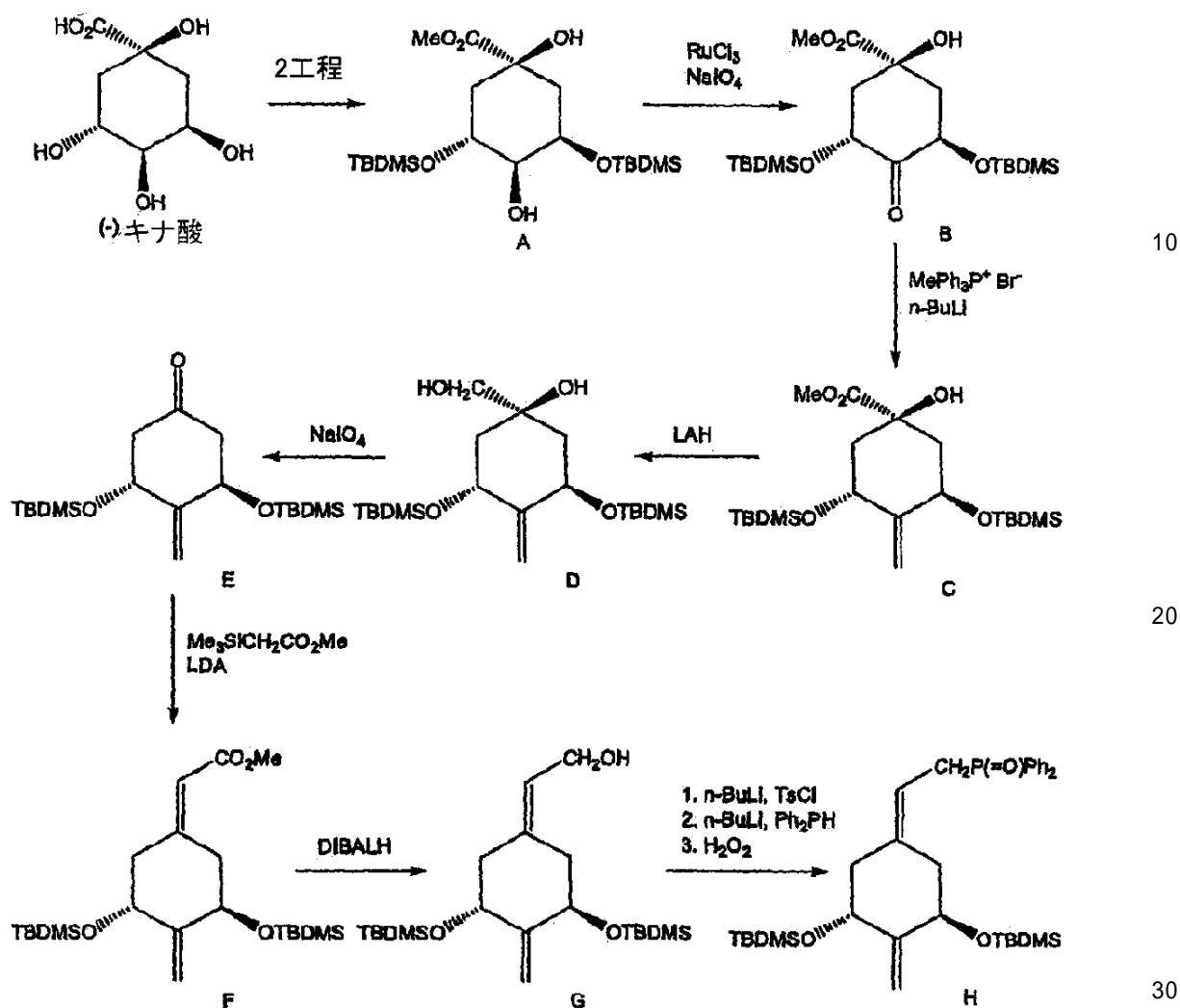
10

20

30

【化7】

スキーム1



【0021】

当業者には容易に分かり、かつ本明細書で述べているような既知の方法又は適合させた方法によって、構造IIのヒドラインダノンを調製できる。ビタミンD類似体を合成するために使用するいくつかの重要な二環式ケトンの特有の例は、Mincione et al., *Synth. Commun.* 19, 723, (1989); 及び Peterson et al., *J. Org. Chem.* 51, 1948, (1986)に記載されているものである。

2-アルキリデン-19-ノル-ビタミンD化合物を合成するための全体的なプロセスは米国特許第5,843,928号明細書(参照によってその全体がすべての目的のため本明細書で完全に述べたかのように本明細書に組み込まれる)に例示かつ説明されている。

【0022】

本明細書では、用語“ヒドロキシ-保護基”はヒドロキシ(-OH)官能基の一時的な保護のために常用されるいずれの基をも意味し、例えば、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、アルキルシリル又はアルキルアリールシリル基(以後、単に“シリル”基と称する)、及びアルコキシアルキル基が挙げられる。アルコキシカルボニル基は、アルキル-O-CO-基、例えば、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又はアリルオキシカルボニルである。用語“アシリル”は炭素数1~6のアルカノイル基、そのすべての異性形、又は炭素数1~6のカルボキシアルカノイル基、例えばオキサリル、マロニル、スクシニル、グルタリ

ル基、又は芳香族アシル基、例えばベンゾイル、或いはハロ、ニトロ又はアルキル置換ベンゾイル基を意味する。アルコキシアルキル保護基は、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、又はテトラヒドロフラニル及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*-ブチルシリル及び同様のアルキル化シリル基である。用語“アリール”は、フェニル基、又はアルキル-、ニトロ-若しくはハロ-置換フェニル基を意味する。ヒドロキシ官能基用の保護基の拡張リストはProtective Groups in Organic Synthesis, Greene, T.W.; Wuts, P. G. M., John Wiley & Sons, New York, NY, (3rd Edition, 1999)で見つかり、それら保護基は該文献記載の手順を用いて付加又は除去することができる。なお、上記文献の内容は参照によってその全体がすべての目的のため本明細書で完全に述べたかのように本明細書に組み込まれる。

“保護されたヒドロキシ”基は、ヒドロキシ官能基の一時的又は永久的保護に常用される上記いずれかの基、例えば以前に定義したようなシリル、アルコキシアルキル、アシル又はアルコキシカルボニル基で誘導体化又は保護されたヒドロキシ基である。

【実施例】

【0023】

【2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₂の合成】

種々の19-ノルビタミンD類似体の合成及び特性は多くの米国特許（例えば、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、米国特許第5,086,191号、米国特許第5,585,369号、及び米国特許第6,537,981号）明細書に記載されている。上記文献の内容は参照によってその全体がすべての目的のため本明細書で完全に述べたかのように本明細書に組み込まれる。

【0024】

スキームI、IIA、及びIIBに示した方法を用いて式I、式IA、及び式IBの化合物を調製した。化合物1は、Sicinski et al.によって記載されているように(J. Med. Chem. 41, 466-4672, 1998)エルゴステロール又はビタミンD₂のオゾン分解によって得られる。化合物1を水素化ホウ素で還元してジヒドロキシ化合物2を生成する。薄層クロマトグラフィー(TLC)でヘキサン中10%の酢酸エチルの溶媒系を用いてこれらの反応を追うことができる。ピリジン中で化合物2を無水酢酸で処理して化合物3を得る。次に、化合物3をトリエチルシリルトリフルオロメタンスルホネートで処理後、塩基性加水分解によって（メタノール中でKOHと加熱）化合物4を得る。この場合もやはり、これらの反応を上記と同じTLCシステムで追う。化合物4を、ピリジン、ジメチルスルホキシド及びトリエチルアミン中、三酸化イオウで酸化して化合物5を得る。反応を酢酸中10%を用いてTLCで追う。化合物5を炭酸水素ナトリウムで処理して該化合物をエピマー化後、メタノール中の水素化ホウ素ナトリウムで還元してアルコール6を得、ヘキサン中20%の酢酸エチルを用いてTLCで検出する。次に、スキームIIAに示される試薬を用いて化合物6を酸化して化合物7を得、順次n-BuLiの存在下で立体特異的なスルホン（化合物8）と反応させた（スキームIIB）。Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin)から得た出発原料を用い、DeLucaらに1998年5月12日に発行された米国特許第5,750,746号明細書に開示されている手順でスルホン8を調製した。結果として化合物9をもたらす無水酢酸とピリジンを用いて、この化合物のアセチル化を行い、TLC（ヘキサン中10%の酢酸エチル）で確認した。次に、ナトリウムアマルガムとの反応によって化合物9を化合物10に変換した。TLC（ヘキサン中10%の酢酸エチル）を用いて化合物10の存在を確認した。p-トルエンスルホン酸ピリジニウムを用いて化合物10の脱保護を行い、ヘキサン中35%の酢酸エチルを用いてTLCで反応を追った。クロロクロム酸ピリジニウムとの反応によって化合物11の酸化を達成した。次に、イミダゾールの存在下でトリメチルシリル基を付加して保護された化合物13を得た。ヘキサン中35%の酢酸エチルを用いてTLCで生成物12と13を検出した。n-BuLiの存在下、保護されたGrundmannのケトン（化合物13）とホスフィンオキシド（化合物14）のWittig-Horner縮合を行った。結果の生成物（化合物15）をTLC（ヘキサン中20%の酢酸エチル）で確認した。最後に、フッ化テトラ

10

20

30

40

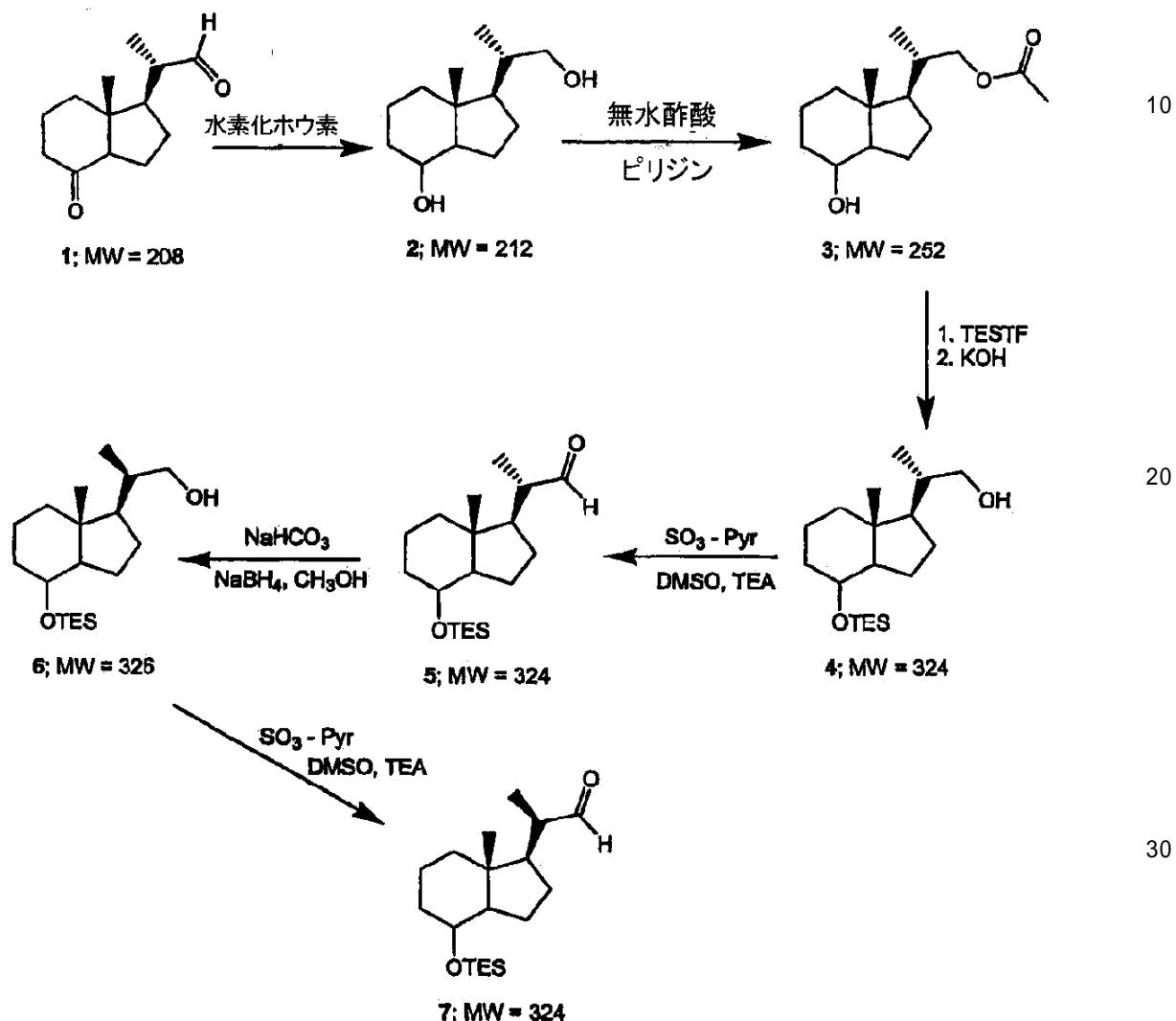
50

ブチルアンモニウムの存在下で脱保護して目的の化合物(化合物16)を得た。クロロホルム中10%のメタノールを用いてTLCで反応を追った。最終生成物のさらなる確認については後述する。

【0025】

【化8】

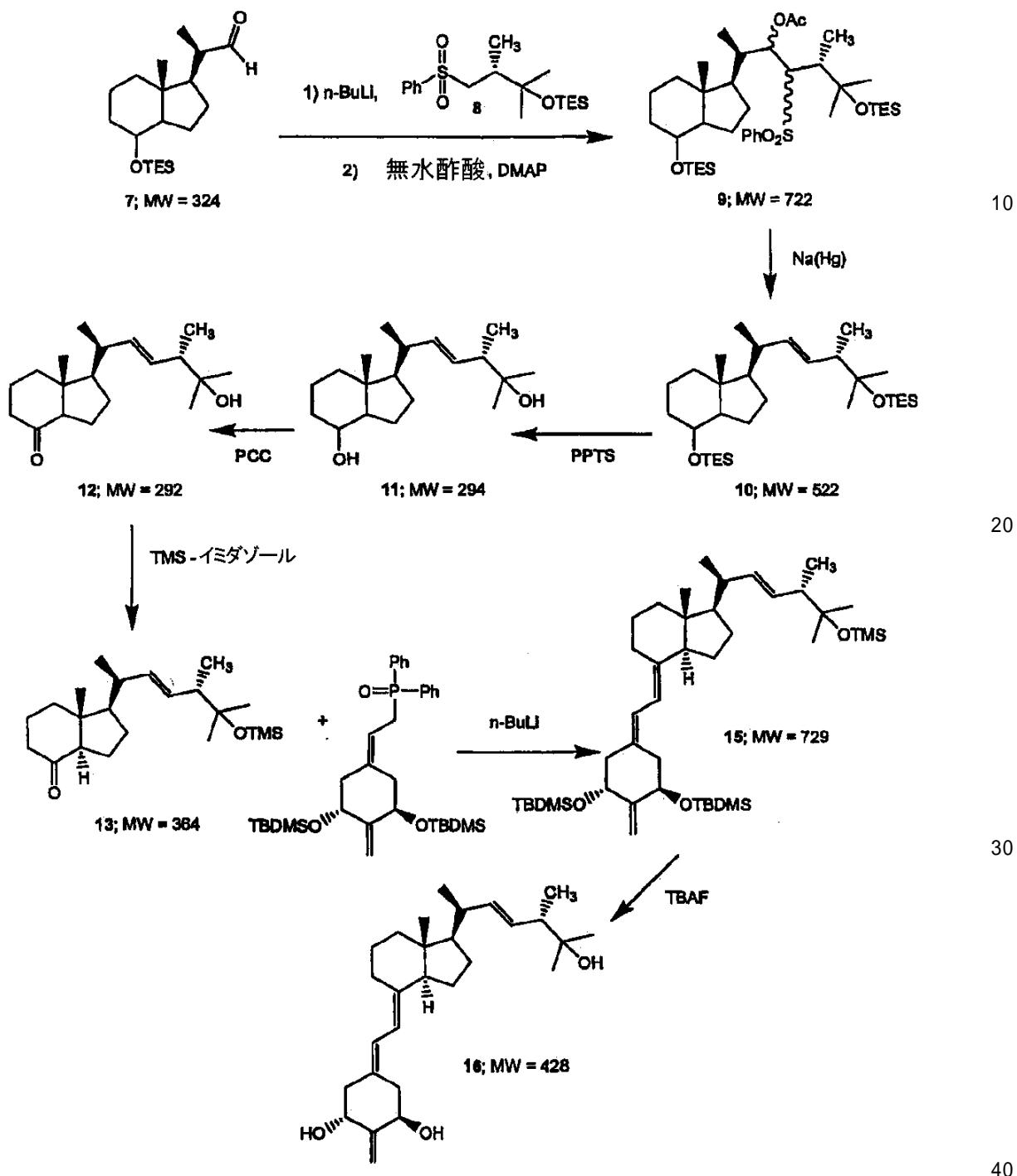
スキームIIA



【0026】

【化9】

スキームIIB



【0027】

[2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₂]

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) 0.524 (3H, s, 18- H_3), 0.938 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 21- H_3), 0.995 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 28- H_3), 1.142 及び 1.169 (3H 及び 3H, それぞれ s, 26- 及び 27- H_3), 1.8-2.2 (5H, br m), 2.28 (1H, dd, $J = 13.2, 8.4$ Hz, 10 α -H), 2.33 (1H, dd, $J = 13.5, 6.3$ Hz, 4 β -H), 2.57 (1H, dd, $J = 13.5, 3.9$ Hz, 4 α -H), 2.80 (1H, m, 9 β -H), 2.85 (1H, dd, $J = 13.2, 4.5$ Hz, 10 β -H), 4.49 (2H, m, 1 β - 及び 3 β -H), 5.09 及び 5.11 (1H 及び 1H, それぞれ s, = CH_2), 5.33-5.49 (2H, br m, 22- 及び 23-H), 5.88 及び 6.35 (1H 及び 1H, それぞれ d, $J = 11.4$ Hz, 7- 及び 6-H); MS (APCI) m/z 411 [(M-50

$+ \text{H}]^+ - \text{H}_2\text{O}$ 。

【 0 0 2 8 】

〔生物活性〕

〔ビタミンD受容体結合性〕

試験材料：

(タンパク質源)

全長組換えラット受容体を大腸菌BL21(DE3) Codon Plus RIL細胞で発現させ、2つの異なるカラムクロマトグラフィーシステムを用いて均質性に精製した。第一システムは、このタンパク質上のC-末端ヒスチジンタグを利用するニッケルアフィニティー樹脂だった。この樹脂から溶出されたタンパク質をさらにイオン交換クロマトグラフィー(S-Sephalose Fast Flow)で精製した。精製タンパク質の一定分量を液体窒素で急速冷凍して使用するまで-80 で貯蔵した。結合アッセイで使用するため、タンパク質をTEDK₅₀ (50mM Tris, 1.5mM EDTA, pH 7.4, 5mM DTT, 150mM KCl) で0.1%のChaps洗浄剤と共に希釈した。添加した放射標識リガンドが最高20%しか受容体に結合しないように、受容体タンパク質とリガンド濃度を最適化した。

(調査薬物)

非標識リガンドをエタノールに溶かし、UV分光光度法で濃度を決定した (1,25(OH)₂D₃ : モル吸光係数 = 18,200及び $\text{max} = 265\text{nm}$; 類似体 : モル吸光係数 = 42,000及び $\text{max} = 252\text{nm}$)。放射標識リガンド (³H-1,25(OH)₂D₃、約159Ci/mmol) をエタノールに1nMの最終濃度で加えた。

【 0 0 2 9 】

アッセイ条件：

放射標識リガンドと非標識リガンドを100mclの希釈タンパク質に10%以下の最終エタノール濃度で加え、混合して一晩氷上でインキュベートして結合平衡に到達させた。次の日、100mclのヒドロキシルアパタイトスラリー(50%)を各管に加え、10分間隔で30分間混合した。ヒドロキシルアパタイトを遠心分離で収集してから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。最後の洗浄後、4mlのBiosafe IIシンチレーション混液を含有するシンチレーションバイアルにペレットを移し、混合し、シンチレーションカウンターに入れた。放射標識リガンドのみを含有する管から全体的な結合性を決定した。

【 0 0 3 0 】

〔HL-60分化〕

試験材料：

(調査薬物)

調査薬物をエタノールに溶かしてUV分光光度法で濃度を決定した。細胞培養中に存在するエタノールの最終濃度(0.2%)を変えないで一連の薬物濃度を試験できるように、段階希釈物を調製した。

(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培地で育てた。5%のCO₂の存在下で細胞を37 にてインキュベートした。

アッセイ条件：

HL60細胞を 1.2×10^5 細胞/mlでプレートした。プレーティング18時間後、二通りの細胞を薬物で処理した。4日後、細胞を収集してニトロブルーテトラゾリウム還元アッセイを行った (Collins et al., 1979; J. Exp. Med. 149:969-974)。全部で200個の細胞を数え、細胞内のブラック-ブルーホルマザン沈着を含む数を記録することによって、分化した細胞のパーセンテージを決定した。食細胞活性を測定することによって、単球細胞への分化の検証を確定した(データ示さず)。

【 0 0 3 1 】

〔*in vitro*転写アッセイ〕

ルシフェラーゼレポーター遺伝子の上流に24-ヒドロキシラーゼ(240hase)遺伝子プロモ

10

20

30

40

50

ーターで安定してトランスフェクトされたROS 17/2.8(骨)細胞で転写活性を測定した(Arbour et al., 1998)。一連の用量で細胞を与えた。投与16時間後、細胞を収集してルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。RLU = 相対ルシフェラーゼ単位。

【0032】

〔腸のカルシウム輸送及び骨のカルシウム動員〕

オスの離乳期Sprague-DawleyラットをDiet 11(0.47% Ca)食餌 + AEKに1週間、次いでDiet 11(0.02% Ca) + AEKに3週間置いた。次に、ラットを1週間0.47% Caを含有する食餌に切り換えた後、2週間0.02% Caを含有する食餌に切り換えた。0.02%のカルシウム食餌の最後の周で用量投与を開始した。4回の連続的なip用量を約24時間間隔で与えた。最終投与24時間後、切斷した首から血液を集め、骨のカルシウム動員の尺度として血清カルシウムの濃度を決定した。反転腸囊法(everted gut sac method)を用いる腸のカルシウム輸送分析のために腸の最初の10cmも回収した。

2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₂は、図1に示されるようにビタミンD受容体への結合性において天然ホルモンとほとんど同等である。2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₂は、HL-60細胞の分化の誘発においても天然ホルモンとほぼ同等であり(図2)、転写の引き起こしにおいては、図3に示されるように、1,25-(OH)₂D₃よりわずかに効率的である。2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1₁,25-ジヒドロキシビタミンD₂は1,25-(OH)₂D₃に匹敵する骨カルシウム動員活性を有し(図4)、本化合物は腸のカルシウム輸送を上昇させる何らかの能力を保持する(図5)。この化合物は、透析患者の続発性副甲状腺機能亢進症及び限定するものではないが、骨減少症、骨粗しょう症などのカルシウムの不均衡障害の有効な療法としての用途を見出すだろう。大腸癌、前立腺癌、及び乳癌という悪性腫瘍の治療のため本化合物を使用することもでき、かつ多発性硬化症、1型及び2型糖尿病、炎症性腸疾患、ループス、リウマチ性関節炎及び筋萎縮性側索硬化症(Lou Gehrig's disease)等の自己免疫性疾患の治療で使用できる。

本発明の化合物は、動物対象における肥満症の予防若しくは治療、脂肪細胞分化の阻害、SCD-1遺伝子転写の阻害、及び/又は体脂肪の低減にも有用である。従って、いくつかの実施態様では、動物対象における肥満症の予防若しくは治療、脂肪細胞分化の阻害、SCD-1遺伝子転写の阻害、及び/又は体脂肪の低減方法は、前記動物対象に、有効量の本化合物又は本化合物を含む医薬組成物を投与することを包含する。前記対象への本化合物又は本化合物を含む医薬組成物の投与は、前記動物対象において脂肪細胞分化を阻害し、遺伝子転写を阻害し、及び/又は体脂肪を低減する。

【0033】

治療目的では、技術上周知の常法に従い、無毒溶媒中の溶液として、或いは適切な溶媒若しくは担体中のエマルジョン、懸濁液又は分散系として、或いは固形担体と共に、丸剤、錠剤又はカプセル剤として、式I、式IA、及び式IBで定義される化合物を製剤化することができる。このようないずれの製剤も他の医薬的に許容しうる、かつ無毒の賦形剤、例えば安定剤、抗酸化剤、結合剤、着色剤又は乳化剤又は食味改良剤などを含んでもよい。医薬的に許容しうる賦形剤及び担体は当業者には一般的に知られているので、本発明に包含される。該賦形剤及び担体は、例えば"Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991)に記載されている。なお、この文献は参照によってその全体がすべての目的のため本明細書で完全に述べたかのように本明細書に組み込まれる。

本化合物を経口、局所、非経口又は経皮投与することができる。本化合物は、有利には、注射により、又は静脈内注入若しくは適切な無菌溶液により、又は消化管(alimentary canal)を経る液体若しくは固体用量の形態で、又はクリーム、軟膏、パッチ、若しくは経皮投与に適した同様のビヒクルの形態で投与される。いくつかの実施態様では、1日当たり0.001 μg ~ 約1mgの本化合物という用量が治療目的に妥当である。いくつかの該実施態様では、妥当かつ有効な用量は、1日当たり0.01 μg ~ 1mgの範囲の本化合物でよい。他の該実施態様では、妥当かつ有効な用量は、1日当たり0.1 μg ~ 500 μgの範囲の本化合物でよい。該用量は、技術上よく理解されるように、治療すべき疾患又は状態のタイプ、該疾

10

20

30

40

50

患又は状態の重症度、及び対象の反応に従って調整されるだろう。本化合物を適宜単独で、又は別の活性なビタミンD化合物と共に投与することができる。

【0034】

本発明で使う組成物は、活性成分として有効量の2-メチレン-19-ノル-(20S-24S)-1,2-ジヒドロキシビタミンD₂と、適切な担体とを含む。本発明のいくつかの実施態様で使う本化合物の有効量は、一般的に本明細書で述べたような薬用量であり、局所、経皮、経口、経鼻、直腸内、又は非経口投与される。

式1A及び式1Bの化合物は、有利には、前骨髄球の正常なマクロファージへの分化を果たすために十分な量で投与される。上述した用量が適するが、技術的によく理解されているように、疾患の重症度、及び対象の状態や反応によって調整すべきである。

10

クリーム、ローション、軟膏、エアロゾル、座剤、局所パッチ、丸剤、カプセル剤若しくは錠剤として、又は医薬的に無毒かつ許容しうる溶媒若しくは油中の溶液、エマルジョン、分散系、若しくは懸濁液として液状形態で本化合物を製剤化することができ、かつ該製剤は、さらに他の医薬的に無毒又は有益な成分、例えば安定剤、抗酸化剤、乳化剤、着色剤、結合剤又は食味改良剤を含有しうる。

本発明の製剤は、医薬的に許容しうる担体と共に活性成分を含むが、任意に、他の治療成分を含んでもよい。担体は、該製剤の他の成分と適合性であり、かつそのレシピエントにとって有害でないという意味で“許容しうる”必要がある。

経口投与に適した本発明の製剤は、それぞれ所定量の活性成分を含有するカプセル剤、サシェ剤、錠剤又はロゼンジ剤のような個別単位の形態；粉末又は顆粒の形態；水性液又は非水性液中の溶液又は懸濁液の形態；又は水中油エマルジョン若しくは油中水エマルジョンの形態でよい。

20

直腸投与用の製剤は、活性成分と、ココアバター等の担体とを組み入れた座剤の形態、又は浣腸剤の形態でよい。

非経口投与に好適な製剤は、通常、好ましくはレシピエントの血液と等張性である、該活性成分の無菌の油性又は水性調合剤を含む。

局所投与に好適な製剤として、液体又は半液体調合剤、例えば軟膏、ローション、水中油若しくは油中水エマルジョン、例えばクリーム、軟膏若しくはペースト；又は溶液又は懸濁液、例えば点滴薬；又はスプレーが挙げられる。

経鼻投与のため、散剤の吸入、自己噴霧又はスプレー缶、ネブライザー若しくはアトマイザーで分配されるスプレー製剤を使用できる。分配する場合、製剤は、好ましくは10～100ミクロンの範囲の粒径を有する。

30

製剤を用量単位形態で提供すると便利であり、薬学の分野で周知のいすれの方法によつても調製することができる。用語“用量単位”とは、単位の、すなわち、活性成分をそのまま、或いは活性成分と固形若しくは液状の医薬用希釈剤又は担体との混合物として活性成分を含んでなる物理的かつ化学的に安定な単位用量として患者に投与できる単一用量を意味する。

【0035】

本明細書で引用したすべての参考文献は、参照によってその全体がすべての目的のため本明細書で完全に述べたかのように本明細書に明確に組み込まれる。

40

本発明は、例示のため本明細書で述べた実施態様に限定されず、添付の特許請求の範囲内に入る限り、本発明はこのようなすべての形態を包含するものと解釈する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】全長組換えラットビタミンD受容体に対する[³H]-1,25-(OH)₂-D₃との結合について競合する(20S/24S)2-MD₂と1,25(OH)₂D₃の相対活性を比較するグラフである。

【図2】(20S/24S)2-MD₂の濃度と1,25(OH)₂D₃の濃度の関数としてHL-60細胞分化の割合を比較するグラフである。

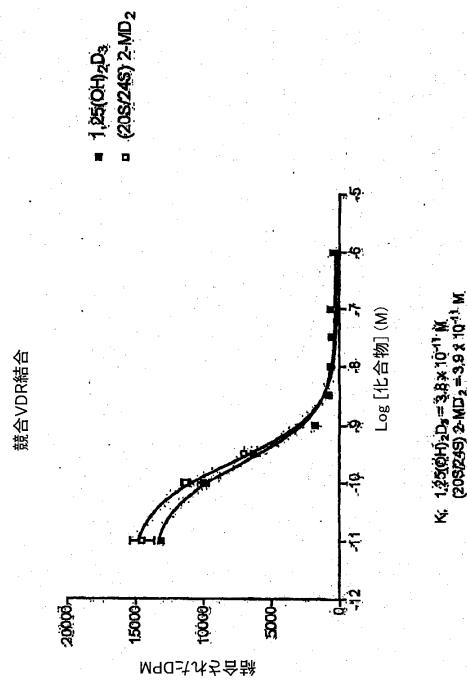
【図3】(20S/24S)2-MD₂のin vitro転写活性と1,25(OH)₂D₃のin vitro転写活性を比較するグラフである。

50

【図4】(20S/24S)2-MD₂の骨カルシウム動員活性と1,25(OH)₂D₃の骨カルシウム動員活性を比較するグラフである。

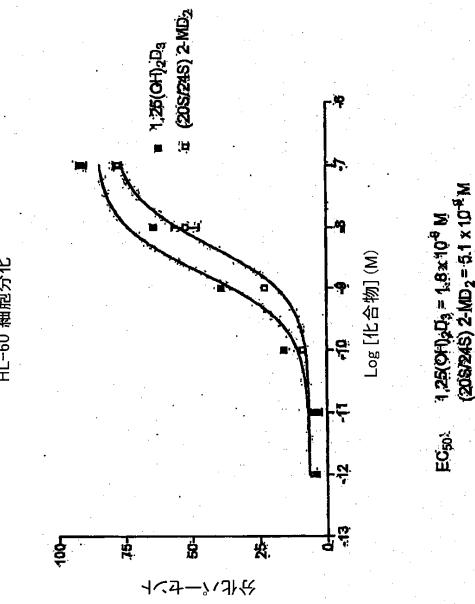
【図5】(20S/24S)2-MD₂の腸カルシウム輸送活性と1,25(OH)₂D₃の腸カルシウム輸送活性を比較するグラフである。

FIGURE 1



【図2】

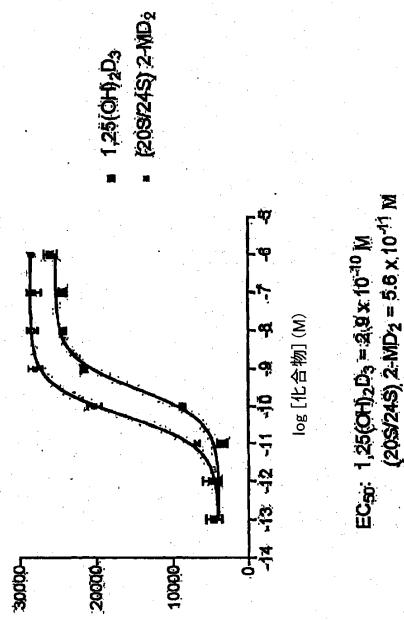
FIGURE 2



【図3】

FIGURE 3

24-OHase 転写



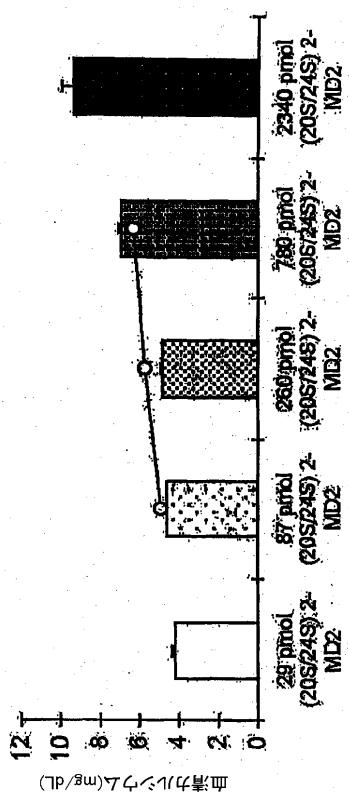
$$EC_{50}: 1,25(OH)_2D_3 = 3.8 \times 10^{-10} M$$

$$(20S)24S-2-MD_2 = 5.6 \times 10^{-11} M$$

【図4】

FIGURE 4

骨カルシウム動員

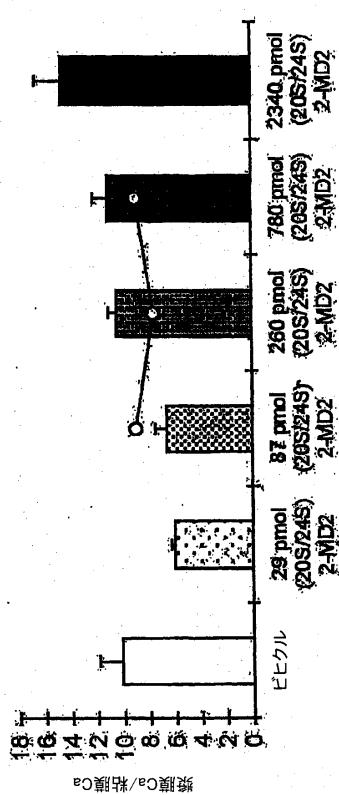


三点を含む線は1,25(OH)2D3で得られた歴史的データを示す。

【図5】

FIGURE 5

腸のカルシウム輸送



三点を含む線は1,25(OH)2D3で得られた歴史的データを示す。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	11/06	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	13/12	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	17/06	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	17/16	A 6 1 P 17/16
A 6 1 P	19/02	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	19/10	A 6 1 P 19/10
A 6 1 P	19/08	A 6 1 P 19/08
A 6 1 P	17/00	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	25/00	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	29/00	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	35/00	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	37/06	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P	3/02	A 6 1 P 3/02 1 0 2

(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 井上 千弥子

(56)参考文献 特表2003-529581(JP, A)

国際公開第2004/092118(WO, A1)

特表2007-502832(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C 401/00

CA/REGISTRY(STN)