(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3567223号

(P3567223)

(45)発行日　平成16年9月22日(2004.9.22)　(24)登録日　平成16年6月25日(2004.6.25)

(51)Int.Cl.[7]	F I
A61K 31/59	A61K 31/59
A61P 3/02	A61P 3/02　102
A61P 3/14	A61P 3/14
// C07C 401/00	C07C 401/00

請求項の数 1　(全 9 頁)

(21)出願番号　特願平7-302167
(22)出願日　平成7年10月25日(1995.10.25)
(65)公開番号　特開平9-100232
(43)公開日　平成9年4月15日(1997.4.15)
審査請求日　平成13年12月25日(2001.12.25)
(31)優先権主張番号　特願平7-215175
(32)優先日　平成7年7月31日(1995.7.31)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

特許法第３０条第１項適用申請有り　平成７年６月８日盛岡グランドホテルで開催された日本ビタミン学会第４７回大会において発表

特許法第３０条第１項適用申請有り　ビタミン第６９巻第４号（平成７年４月２５日）日本ビタミン学会発行第２３８－２３９ページに発表

(73)特許権者　595121847
山田　幸子
東京都八王子市初沢町１２２７－４－Ａ１２１８
(74)代理人　100095832
弁理士　細田　芳徳
(72)発明者　山田　幸子
東京都八王子市初沢町１２２７－４

審査官　内田　俊生

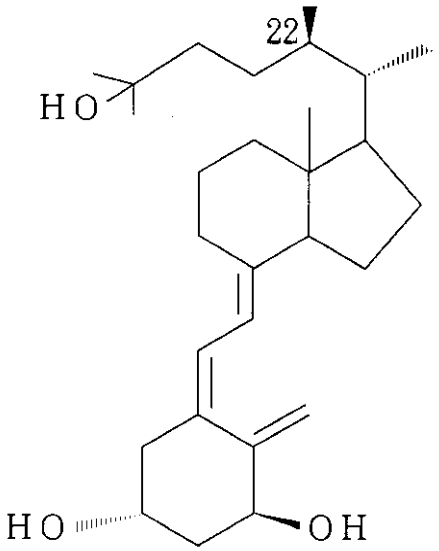
(56)参考文献　特開平６－２５１５５（ＪＰ，Ａ）
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 4 May 1995, Volume 5, Issue 9, Pages 979-984

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カルシウム代謝改善剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記の式（Ｉ）

【化１】



で示される（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　を有効成分とするカルシウム代謝改善剤。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$を有効成分とするカルシウム代謝改善剤に関する。

【０００２】

【従来の技術】

近年、ビタミンＤ研究の進展に伴い、各種の１α－ヒドロキシビタミンＤ誘導体が医薬品として開発されてきている。例えば、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　の８分の１の１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体への結合活性を有し、かつビタミンＤ結合蛋白質との親和性が１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　の１／６００と低い２２－オキサ－１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　は、副甲状腺機能亢進症治療剤として検討されてきている（Ｊ．　Ｎｕｔｒ．　Ｓｃｉ．　Ｖｉｔａｍｉｎｏｌ．，　３５巻、５２９頁（１９８９年）、Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，　１１５巻、　３７３頁（１９９４年）参照）。

また、２２位にメチル基を有するビタミンＤ誘導体が、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体に対して１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　とほぼ同程度の結合活性を有することも知られている（特開平６－２５１５５号公報参照）。

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、疾患を治療する立場からは、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体との結合活性が上記の化合物より高活性でかつ安全性の高いビタミンＤ誘導体の開発が望まれているのが現状である。

しかして、本発明の目的は、かかる作用特性を有するビタミンＤ$_3$　誘導体を有効成分とするカルシウム代謝改善剤を提供することにある。

【０００４】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、種々のビタミンＤ$_3$　誘導体について鋭意研究した結果、２０位と２２位における立体配位の異なる４種の２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$

異性体のうち、２０位の立体配位をエピ体とした（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ が、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ 受容体との結合活性において他の異性体と比較して顕著に高く、しかもビタミンＤ結合蛋白質との親和性が低いことを見出し、本発明を完成するに到った。

【０００５】

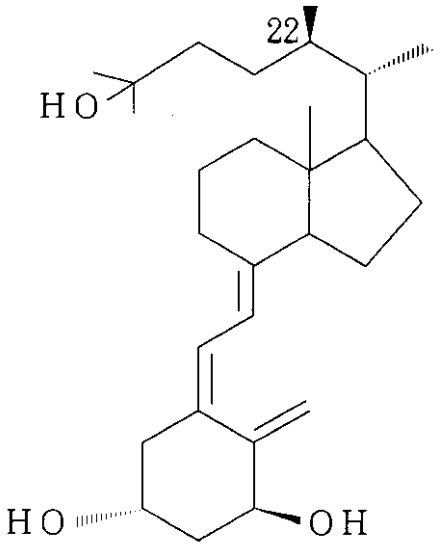
即ち、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ 受容体との結合活性は、同様に２０位の立体配位をエピ体とした（２０Ｓ，２２Ｓ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ の場合、１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ に比較して１／４００倍の活性を示すのに対し、意外にも本発明における（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ の場合、１８倍の活性を示すことが見いだされた。従来より公知のビタミンＤ$_3$ 誘導体の中で天然型の１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ に比較して受容体との結合活性の高いものはわずかであり、高くてもせいぜい２～３倍程度（Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ，１６巻、２号、２００頁（１９９５年））であるのに対し、本発明の誘導体のような１８倍もの高い結合活性は驚愕すべき発見である。

【０００６】

即ち、本発明は、下記の式（Ｉ）

【０００７】

【化２】



【０００８】

で示される（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ を有効成分とするカルシウム代謝改善剤に関する。

【０００９】

【発明の実施の形態】

式（Ｉ）で示される（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ は、（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチルプロビタミンＤ誘導体を用いて常法に従って製造することができる。即ち、例えば（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチルプロビタミンＤ誘導体を無酸素状態を維持しつつ光異性化し、さらに熱異性化することにより得ることができる。なお、プロビタミンＤ誘導体の合成を含めた詳細な製造方法は、特開平６－２５１５５号公報に記載されている。

【００１０】

このようにして得られた式（Ｉ）で示される（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$ の単離・精製は、一般に有機化合物を反応溶液から単

離・精製するに際して用いられている方法と同様の方法により行われる。例えば、反応溶液を濃縮して粗生成物を得、該粗生成物をクロマトグラフィーにより精製して得ることができる。

【００１１】式（Ｉ）で示される（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$は、後述の試験例から明らかなとおり、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$受容体との結合活性が１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$と比較して１８倍と極めて高く、かつビタミンＤ結合蛋白質との親和性は１／５００倍と低い。また、急性毒性試験においても低毒性であったことから、副作用の少ない、カルシウム代謝改善剤、例えば副甲状腺機能亢進症治療剤として有用である。

【００１２】

式（Ｉ）で示される（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　を有効成分とするカルシウム代謝改善剤は、適当な剤型の医薬組成物として経口または非経口的に投与することができる。投与量は年齢、症状、投与ルート等によっても異なるが、例えば成人のカルシウム代謝欠陥症の予防、治療のために投与する場合、通常成人１日あたり０．０１μｇから５μｇを、好ましくは０．０５μｇ～１μｇを１ないし３回に分けて投与するのが好都合であるが、医者の診断に応じて上記範囲を超えて投与することももちろん可能である。

【００１３】

本発明のカルシウム代謝改善剤は、有効成分化合物の有効量と薬理学的に許容される担体もしくは賦形剤とを含む組成物であってもよい。このような組成物は経口または非経口投与に適する剤型として提供される。

【００１４】

即ち、経口投与のための組成物としては、固体もしくは液体の剤型、具体的には錠剤、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などである。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体もしくは賦形剤を含有するものである。例えば錠剤用の担体、賦形剤としては乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどである。

【００１５】

非経口投与のための組成物としては、例えば注射剤であれば、公知の方法に従い、通常注射剤に用いられる無菌の水性ないしは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製される。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖などやその他の補助液を含む等張液などがあり、これらは適当な溶解補助剤などと併用してもよい。

【００１６】

このような本発明のカルシウム代謝改善剤は、有効成分化合物との配合により好ましくない相互作用を生じないかぎり、他の活性成分を含んでいてもよい。

【００１７】

【実施例】

以下、実施例および試験例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。

【００１８】

実施例

（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　の合成

特開平６－２５１５５号公報の記載に準じて合成した（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチルコレスター５，７－ジエン－１α，３β，２５－トリオール６．７５ｍｇ（０．０１５７ｍｍｏｌ）をベンゼン－エタノール（１５０：２０）１７０ｍＬに溶解し、高純度アルゴンガス（９９．９９９％）を２０分間吹き込んだのち、予め５分間安定化させた１００Ｗ高圧水銀ランプを用い、０℃で２分間パイコールフィルターを通して紫外線を照射した。得られた反応液を濃縮し、カラムとしてセファデックスＬＨ－２０（登録商標）（ファルマシア社製）を用い、クロロホルム／ヘキサン／メタノール（７０：３０：０．７）を展開溶媒として分離することにより、プレビタミンを得た。

【００１９】
得られたプレビタミンを９５％エタノール５ｍｌに溶解し、アルゴン雰囲気下、室温暗所にて２週間放置した。反応液を濃縮し、カラムとしてセファデックスＬＨ－２０（登録商標）を用い、クロロホルム／ヘキサン／メタノール（７０：３０：１）を展開溶媒して分離することにより、下記の物性を有する、（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　（化合物１）を１．６８ｍｇ得た（収率２４．８％）。
【００２０】
^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（δ値）
０．５３（３Ｈ，ｓ，Ｈ－１８）、０．７５，０．８６（各３Ｈ、ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ、Ｈ－２１および－２２Ｍｅ）、１．２２（６Ｈ，ｓ，Ｈ－２６およびＨ－２７）、４．２３（１Ｈ，ｍ，Ｈ－３）、４．４３（１Ｈ，ｍ，Ｈ－１）、５．００，５．３３（各１Ｈ，ｓ，Ｈ－１９）、６．０２，６．３８（各１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．３Ｈｚ，Ｈ－７および－６）
質量スペクトル（ＥＩ）　ｍ／ｚ（相対強度）
４１２（Ｍ’－$Ｈ_2$　Ｏ，１８）、３９４（８２）、３７９（１００）、２５１（３５）、２４９（２３）、２０９（２２）、１９７（２２）、１５５（３６）、１４１（２１）、１０５（２６）、６９（２２）、５５（１６）
【００２１】
比較例
実施例において、原料として（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチルコレスター５，７－ジエン－１α，３β，２５－トリオールと異なる立体配位を有する原料化合物を用いること以外は、実施例と同様にして、（２０Ｓ，２２Ｓ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　（化合物２）、（２０Ｒ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　（化合物３）及び（２０Ｒ，２２Ｓ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　（化合物４）を合成した。
【００２２】
試験例１
ブタ小腸１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　受容体との結合性試験
実施例および比較例で得られた化合物１、化合物２、化合物３および化合物４を用いて、ブタ小腸１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　受容体との結合能を測定した。
ブタ小腸核レセプター抽出液をＤａｍｅらの方法〔Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８２巻、７８２５頁（１９８５年）参照〕にしたがって調製し、１／３０に希釈した。試験管に、上記で得られたブタ小腸核レセプター抽出液１００μＬおよびトリチウムラベルした１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　のエタノール溶液５μＬ（トリチウムラベルした１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　の最終濃度１０^{-9}Ｍ）を加え、攪拌した。
【００２３】
得られた溶液に、化合物１、化合物２、化合物３もしくは化合物４の段階的希釈エタノール溶液５μＬ（０．０２５，　０．０５，　０．１，　０．２５，　０．５，　１，　２．５，　１０，　５０，　２５０および　１０００ｎＭ）、またはエタノールのみ（空試験）のいずれかを加え、攪拌した後、２時間室温で振動浴内に放置した（振動数１２０回転／分）。次いで、０℃にて各々に５０μＬのヒドロキシアパタイトの懸濁液（上記文献参照）を加え、１０分間ずつ３回攪拌した。遠心分離（６００ｘｇ、１０分）して上層を除き、ペレットを３回、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００／ＴＥＤ－ｂｕｆｆｅｒ溶液（上記文献参照）で洗浄した。ペレットをＢｉｏｓａｆｅシンチレーターを含むシンチレーションバイヤルへ移し、放射活性を測定し、１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　受容体に結合しているトリチウムラベルした１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　の割合を求めて、１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　受容体と結合しているトリチウムラベルした１α，２５－ジヒドロキシビタミン$Ｄ_3$　の５０％が被検化合物（化合物１、化合物２、化合物３および化合物４）と交換する被検化合物の濃度（$ＥＤ_{50}$値）を求

めた。なお、化合物１は活性が強いため、６０％交換値を求めた。対照として１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　を用いて同様の試験を行い、該化合物のＥＤ$_{50}$値を求め、これを１とした時の化合物１、化合物２、化合物３および化合物４の結合活性を求め、結果を表１に示した。

【００２４】

【表１】

被検化合物	結合活性
１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$（対照）	１
化合物１	１８
化合物２	１／４００
化合物３	１／６０
化合物４	１／３

【００２５】

表１に示されるように化合物１は、対照の１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　よりも１８倍もの高活性を有することがわかった。

【００２６】

試験例２

ウシ胸腺１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体との結合性試験

実施例および比較例で得られた化合物１、化合物２、化合物３および化合物４を用いて、ウシ胸腺１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体との結合能を測定した。

即ち、化合物１、化合物２、化合物３および化合物４の段階的希釈溶液（８，１６，３２，６３，１２５，２５０，５００，５０００ｐｇ／５０μＬエタノール溶液）の各々に、トリチウムラベルした１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　（約５０００ｃｐｍ）を加え、次いでウシ胸腺１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体（株式会社ヤマサ製）溶液（０．１２５ｍｇ／５００μＬリン酸緩衝液）を添加し、攪拌した。４℃で一夜放置した後、ＤＣＣ（デキストランコーテッドチャコール）懸濁液（株式会社ヤマサ製）を加え、攪拌し、１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体に結合していない試料（遊離型）を吸着させた。反応混合物を遠心分離（３０００ｒｐｍ）することにより、ＤＣＣを分離し、１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体と結合している試料（結合型）を遊離型から分離（ＢＦ分離）した。上清５００μＬをとり、シンチレーションカウンターにて放射活性を測定し、１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体に結合しているトリチウムラベルした１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　の割合を求めて、１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　受容体と結合しているトリチウムラベルした１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　の５０％が被検化合物（化合物１、化合物２、化合物３および化合物４）と交換する被検化合物の濃度（ＥＤ$_{50}$値）を求めた。なお、化合物１は活性が強いため、６０％交換値を求めた。対照として１α，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$　を用いて同様の試験を行い、該化合物のＥＤ$_{50}$値を求め、これを１とした時の化合物１、化合物２、化合物３および化合物４の結合活性を求め、結果を表２に示した。

【００２７】

【表２】

被検化合物	結合活性
1，25－ジヒドロキシビタミンD_3（対照）	1
化合物1	11
化合物2	1／250
化合物3	1／50
化合物4	1／3

【００２８】
表２に示されるように化合物１は、対照の１α，２５－ジヒドロキシビタミンD_3　よりも１１倍もの高活性を有することがわかった。
【００２９】
試験例３
ビタミンＤ結合蛋白質への結合実験
ビタミンＤ欠乏症ラットの血清を、０．１３ＭのＮａＣｌを含んだ３．５ｍＭバルビツレート緩衝液　（ｐＨ　８．６）　で１００００倍に希釈した。カルチャーチューブに、順次濃度を変えた化合物１、化合物２、化合物３および化合物４の溶液４０μＬ（９５％エタノール溶液；１，２，４，８，１６，　３２，　６３，　１２５，　２５０，　５００，１０００　および　２０００ｎｇ／４０μＬ）及びトリチウムラベルした２５－ヒドロキシビタミンD_3　（４．４４ＴＢｑ／ｍｍｏｌ）１１０００ｄｐｍ／３０μＬ（９５％エタノール溶液）を加えておいた。これに、先に調製したビタミンＤ欠乏症ラット血清の希釈溶液を５００μＬずつ加えボルテックスした。４℃で１時間インキュベーション後、ＤＣＣ懸濁液２５０μＬを加えボルテックスした。４℃で１５分放置した後、遠心分離した（４℃、３０００ｒｐｍ、１０分）。上清を５００μＬとり、放射活性を測定し、ビタミンＤ結合蛋白質に結合しているトリチウムラベルした２５－ヒドロキシビタミンD_3　の割合を求めて、ビタミンＤ結合蛋白質と結合しているトリチウムラベルした２５－ヒドロキシビタミンD_3　の５０％が被検化合物（化合物１、化合物２、化合物３および化合物４）と交換する被検化合物の濃度（ED_{50}値）を求めた。なお、化合物１、化合物２および化合物３は活性が弱いため、３０％交換値を求めた。対照として１α，２５－ジヒドロキシビタミンD_3　を用いて同様の試験を行い、該化合物のED_{50}値を求め、これを１とした時の化合物１、化合物２、化合物３および化合物４の結合活性を求め、結果を表３に示した。
【００３０】
【表３】

被検化合物	結合活性
1，25－ジヒドロキシビタミンD_3（対照）	1
化合物1	1／500
化合物2	1／500
化合物3	1／220
化合物4	2／3

【００３１】
表３に示されるように化合物１は、ビタミンＤ結合蛋白質への結合性が最も低いことが判明した。
これらの試験結果より、実施例で得られた（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンD_3　は、１α，２５－ジヒドロキシビタミンD_3　受容体との高い結合活性を有し、かつ、ビタミンＤ結合蛋白質との親和性が低いことが分かった。
【００３２】
製剤例（軟カプセル剤）
Ｏ．Ｄ．Ｏ．（中鎖脂肪酸のトリグリセライド；日清製油社製）６００ｇに（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンD_3　１ｍｇを溶解し、安定化剤としてソルビン酸３０ｍｇを加え、常法に従いゼラチン皮膜軟カプセル製造機により１カプセル当たり（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンD_3　を０．１μｇ含有する軟カプセル剤を製造した。
【００３３】
【発明の効果】
本発明によれば、１α，２５－ジヒドロキシビタミンD_3　受容体に対する結合活性が高く、かつ安全性の高い、（２０Ｓ，２２Ｒ）－２２－メチル－１α，２５－ジヒドロキシビタミンD_3　を有効成分とするカルシウム代謝改善剤が提供される。

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)

A61K 31/59 - 31/593

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)