

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02008/149563

発行日 平成22年8月19日 (2010.8.19)

(43) 国際公開日 平成20年12月11日 (2008.12.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/575 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/575	4 C 0 8 6
<b>C 0 7 J 9/00 (2006.01)</b>	C 0 7 J 9/00	4 C 0 9 1
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 3	
<b>A 6 1 P 19/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
<b>A 6 1 P 17/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 19/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く

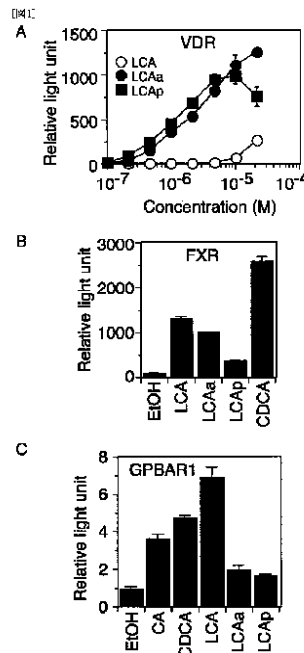
出願番号 特願2009-517731 (P2009-517731)	(71) 出願人 899000057 学校法人日本大学 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2008/050027	
(22) 国際出願日 平成20年1月7日 (2008.1.7)	
(31) 優先権主張番号 特願2007-147866 (P2007-147866)	(74) 代理人 100098121 弁理士 間山 世津子
(32) 優先日 平成19年6月4日 (2007.6.4)	(74) 代理人 100107870 弁理士 野村 健一
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 横島 誠 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
	(72) 発明者 石澤 通康 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 作用選択的ビタミンD受容体作用剤

(57) 【要約】

ビタミンD3製剤の副作用である高カルシウム血症を誘導しないVDRリガンドを提供する。 リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグを含む組成物。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグを含む組成物。

## 【請求項 2】

ビタミンD受容体を活性化させるための請求項 1 記載の組成物。

## 【請求項 3】

医薬として使用される請求項 1 又は 2 記載の組成物。

## 【請求項 4】

ビタミンD受容体が関与する疾患を予防及び / 又は治療するための請求項 3 記載の組成物

10

## 【請求項 5】

骨粗鬆症、悪性新生物、尋常性乾癬、自己免疫疾患、感染症及び神経変性疾患から成る群より選択される疾患を予防及び / 又は治療するための請求項 3 又は 4 記載の組成物。

## 【請求項 6】

ビタミンD受容体を有する細胞、組織、器官又は動物個体をリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグで処理することを含む、ビタミンD受容体を活性化させる方法。

## 【請求項 7】

リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの医薬的に有効な量を被験者に投与することを含む、ビタミンD受容体が関与する疾患を予防及び / 又は治療する方法。

20

## 【請求項 8】

ビタミンD受容体を活性化させるためのリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの使用。

## 【請求項 9】

ビタミンD受容体が関与する疾患を予防及び / 又は治療するための医薬を製造するためのリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

30

## 【0001】

本発明は、作用選択的ビタミンD受容体作用剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

活性型ビタミンD3は、ビタミンD受容体(VDR)を介して、生体のカルシウム・リン酸代謝及び骨代謝を調節する。ビタミンDの欠乏症は、くる病や骨軟化症を引き起こし、活性型ビタミンD3やその誘導体はそれらの治療薬として使用されている。ビタミンD誘導体の内服剤は骨粗鬆症の治療薬として、また塗布剤は尋常性乾癬の治療薬として使用されている。

40

ビタミンD誘導体には、悪性腫瘍（骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌など）の増殖を抑制し、分化を誘導する作用のあること、免疫調節作用（自己免疫疾患モデルにおける治療効果）及び自然免疫増強作用（抗結核作用）があることなどが報告されている（非特許文献1）。

## 【0003】

しかし、ビタミンD誘導体を動物へ投与した場合、血中カルシウム濃度を上昇させる作用（副作用）とVDRを介する他の作用との分離が困難であった。

胆汁酸であるリトコール酸もVDRリガンドとして機能することが明らかになった（非特許文献2）。リトコール酸よりもVDRに対する活性の強いリトコール酸誘導体リトコール酸アセテートが報告された（非特許文献3）。リトコール酸アセテートは、白血病細胞の分化を誘導した。

50

リトコール酸は、VDR以外にも、核内受容体farnesoid X receptor (FXR)や膜型受容体(GPBAR1)を活性化させる作用がある(非特許文献4及び5)。リトコール酸アセテートは、リトコール酸よりも効果的にVDRを活性化したが、FXRに対する活性はケノデオキシコール酸よりは弱いリトコール酸と同程度に残存した(非特許文献3)。

【0004】

【非特許文献1】Expert Opin Ther Targets Vol. 10, 2006, pp.735-748

【非特許文献2】Science Vol. 296, 2002, pp.1313-1316

【非特許文献3】J Lipid Res Vol. 46, 2005, pp.46-57

【非特許文献4】Science Vol. 284, 1999, pp1362-1365

【非特許文献5】Biochem Biophys Res Commun Vol. 298, 2002, pp714-719

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、ビタミンD誘導体の副作用である血中カルシウム上昇作用(高カルシウム血症)を誘導しないVDRリガンドを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らの研究により、以下の知見が得られた。

1. リトコール酸プロピオネートは、リトコール酸アセテートと同程度にVDRを活性化したが、FXRに対する作用は極めて弱かった。リトコール酸プロピオネートの膜型胆汁酸受容体GPBAR1に対する効果は、極めて弱かった。従って、リトコール酸プロピオネートは、リトコール酸やリトコール酸アセテートよりも、選択的なVDRリガンド(活性化剤)である。

20

2. マウスを用いた実験において、リトコール酸プロピオネートと、ビタミンD3誘導体(1-ヒドロキシビタミンD3)との作用を、腎臓でのVDR標的遺伝子CYP24の発現を同程度に誘導する投与量において比較した。1-ヒドロキシビタミンD3は、マウスの体重を減少させ、高カルシウム血症を誘導したが、リトコール酸プロピオネートは体重や血中カルシウム濃度に影響を与えなかった。

3. リトコール酸プロピオネートは、骨髄性白血病HL-60及びU937細胞の分化マーカーを誘導した。

30

本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。

【0007】

本発明の要旨は以下の通りである。

(1) リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグを含む組成物。

(2) ビタミンD受容体を活性化させるための(1)記載の組成物。

(3) 医薬として使用される(1)又は(2)記載の組成物。

(4) ビタミンD受容体が関与する疾患を予防及び/又は治療するための(3)記載の組成物。

(5) 骨粗鬆症、悪性新生物、尋常性乾癬、自己免疫疾患、感染症及び神経変性疾患から成る群より選択される疾患を予防及び/又は治療するための(3)又は(4)記載の組成物。

40

(6) ビタミンD受容体を有する細胞、組織、器官又は動物個体をリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグで処理することを含む、ビタミンD受容体を活性化させる方法。

(7) リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの医薬的に有効な量を被験者に投与することを含む、ビタミンD受容体が関与する疾患を予防及び/又は治療する方法。

(8) ビタミンD受容体を活性化させるためのリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの使用。

50

(9) ビタミンD受容体が関与する疾患を予防及び/又は治療するための医薬を製造するためのリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの使用。

【発明の効果】

【0008】

リトコール酸プロピオネートは、VDRリガンド(作用剤)として有効である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2007 147866の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、VDR、FXR及びGPBAR1に対するリトコール酸プロピオネートの活性化作用を示す。LCA、リトコール酸；LCAa、リトコール酸アセテート；LCAp、リトコール酸プロピオネート；EtOH、エタノール；CDCA、ケノデオキシコール酸；CA、コール酸。化合物の濃度は、VDRに対して図の通り、FXRに対して18 $\mu$ M、GPBAR1に対して10 $\mu$ Mで検討した。

【図2】図2は、マウスに対するリトコール酸プロピオネートの効果を示す。Aは、マウスの体重変化を示す。Bは、腎臓におけるCYP24のmRNAの発現を示す。Cは、血漿カルシウム濃度を示す。1 $\alpha$ -ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>は、12.5 nmol/kg体重(Aの、B、CのVD<sub>3</sub>)、リトコール酸アセテートは、30mg/kg体重(Aの、B、CのL)または300mg/kg体重(Aの、B、CのH)、リトコール酸プロピオネートは、30mg/kg体重(Aの、B、CのL)または300mg/kg体重(Aの、B、CのH)。

【図3】図3は、リトコール酸プロピオネートによる骨髄性白血病HL60細胞の分化誘導効果を示す。リトコール酸プロピオネート10 $\mu$ M及び30 $\mu$ Mの効果と1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> 100nM、リトコール酸アセテート10 $\mu$ M及び30 $\mu$ Mの効果と比較した。EtOH、エタノール；VD<sub>3</sub>、1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>；LCAa、リトコール酸アセテート；LCAp、リトコール酸プロピオネート。

【図4】図4は、マウスにおけるリトコール酸誘導体の腹腔内投与の効果を示す。Aは、マウスの体重変化を示す。Bは、血漿カルシウム濃度を示す。Cは、腎臓におけるCyp24a1、カルビンジンD<sub>9k</sub>、Trpv6及びTrpv5のmRNAの発現を示す。\*は、溶媒対照と比較して、p<0.05、\*\*は、p<0.01、\*\*\*は、p<0.001を示す。Dは、小腸粘膜におけるCyp24a1のmRNAの発現を示す。p=0.190(溶媒対照vs.1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub>)。マウスには、溶媒対照(Cont)(n=3)、12.5 nmol/kg 1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)(n=3)、0.7 mmol/kg リトコール酸アセテート(LCAa)(n=3)又は0.7 mmol/kg リトコール酸プロピオネート(LCAp)(n=3)を0、2、4及び6日目に腹腔内投与した。8日目に血液を心臓穿刺により採取し、8日目に組織mRNAを調べた。

【図5】図5は、マウスにおけるリトコール酸誘導体の経口投与の効果を示す。Aは、マウスの体重変化を示す。Bは、血漿カルシウム濃度を示す。Cは、腎臓におけるCyp24a1、カルビンジンD<sub>9k</sub>、Trpv6及びTrpv5のmRNAの発現を示す。Dは、小腸粘膜におけるCyp24a1、カルビンジンD<sub>9k</sub>、及びTrpv6のmRNAの発現を示す。マウスには、溶媒対照(Cont)(n=3)、12.5 nmol/kg 1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)(n=3)、0.7 mmol/kg (n=3)若しくは1 mmol/kg (n=6)リトコール酸アセテート(LCAa)又は0.7 mmol/kg (n=3)若しくは1 mmol/kg (n=3)リトコール酸プロピオネート(LCAp)を0、2、4、6、8及び10日目に経管栄養で投与した。0、2、4、6、8日目に血液を尾から採取し、12日目に心臓穿刺により採取した。12日目に組織mRNAを調べた。\*は、溶媒対照と比較して、p<0.05、\*\*は、p<0.01、\*\*\*は、p<0.001を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグを含む組成物を提供する。

リトコール酸プロピオネートは、以下の構造式で表される。

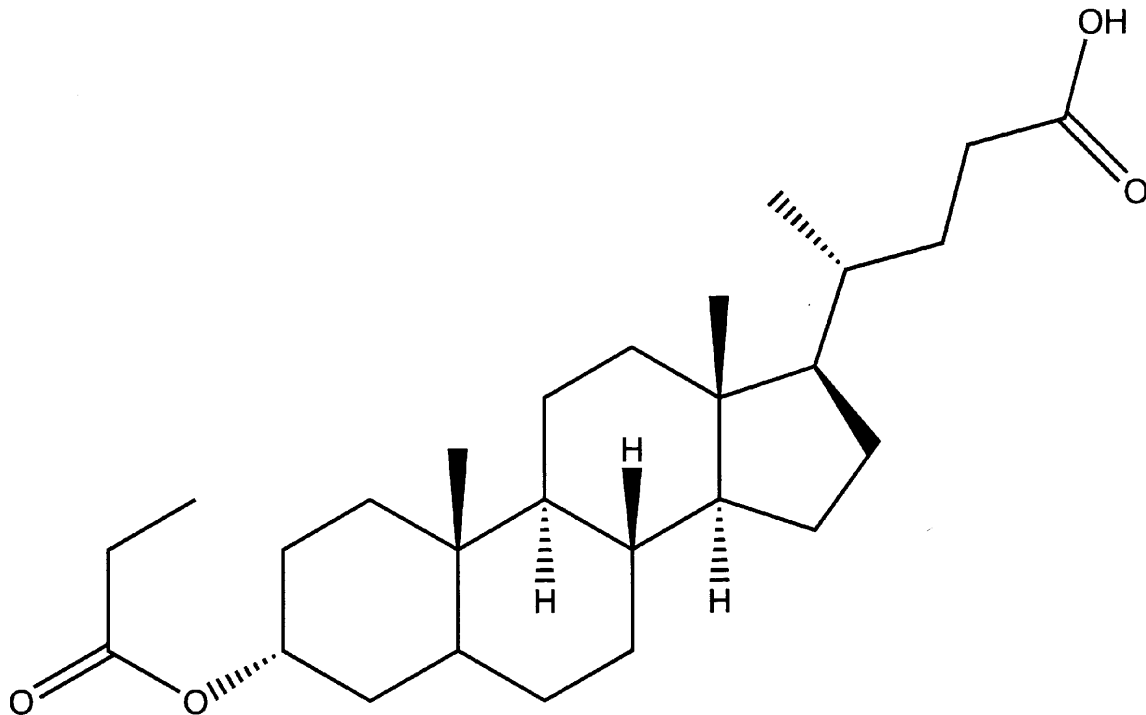
10

20

30

40

## 【化 1】



10

20

リトコール酸プロピオネートは、以下の(1)または(2)の方法で製造することができる。

## 【0011】

(1) リトコール酸と無水プロピオン酸を酸触媒(例えば $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$ )存在下に有機溶媒(例えばテトラヒドロフラン)中で加熱する方法; (2) リトコール酸のカルボキシル基をベンジル基などで保護した後、アルコール部分をプロピオン酸塩化物とピリジン中で反応させ、カルボン酸の保護基を除去する方法。

30

リトコール酸プロピオネートは、VDRに対する活性化作用を有する。VDRに対する活性化作用は、例えば、Science Vol. 284, 1999, pp1362-1365; Science Vol. 296, 2002, pp. 1313-1316に記載の方法に従い、以下のようにして調べることができる。VDR発現ベクターとVDR反応性のレポーター遺伝子を細胞に導入し、この細胞を被験化合物(例えば、リトコール酸プロピオネート)で処理した後、レポーター活性を測定する。無処理の細胞と比較して、レポーター活性が上昇していれば、VDRが活性化されたと判定する。

リトコール酸プロピオネートは、VDR標的遺伝子の誘導を引き起こすが、高カルシウム血症は引き起こさないことが確認された(後述の実施例参照)。従って、リトコール酸プロピオネートは、ビタミンD誘導体の副作用である血中カルシウム上昇作用(高カルシウム血症)を誘導しないVDRリガンドとして有用である。

40

## 【0012】

リトコール酸プロピオネートを医薬として用いる場合には、通常の方法により、医薬的に許容される塩にしてもよい。リトコール酸プロピオネートの塩としてはナトリウム、カリウム、カルシウムなどの無機塩やアンモニアや有機アミン類の塩が挙げられる。有機アミンとしては例えばトリエチルアミンのような第三級アミン、ジエチルアミンのような第二級アミン、エチルアミンのような第一級アミン、キヌクリジンやピリジンなどの複素環アミンなどが挙げられる。

リトコール酸プロピオネート及びその塩は、水、メタノール、エタノール、アセトニト

50

リルなどの溶媒と溶媒和物を生成したものであってもよい。また、溶媒和物は、単独のものであっても、複数種の混合物であってもよい。

【0013】

リトコール酸プロピオネートは、プロドラッグにしてもよい。プロドラッグは、生体に投与された後、酵素の作用や代謝的加水分解などにより、医薬的に活性な化合物になる。プロドラッグは、当業者に知られている酸誘導体であればよく、例えば、リトコール酸プロピオネートと適当なアルコールとの反応によって製造されるエステル、リトコール酸プロピオネートと適当なアミンとの反応によって製造されるアミド、カルボシル基の還元型として、2,4-アルコール体などが挙げられる。

【0014】

リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物及びそのプロドラッグは、ビタミンD受容体を活性化させる薬剤として利用できる。この薬剤は、医薬としても、また、実験用試薬としても用いることができる。

医薬として利用する場合には、ビタミンD受容体が関与する疾患の予防及び/又は治療に用いることができる。具体的には、骨粗鬆症、悪性新生物（例えば、骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌など）、尋常性乾癬、自己免疫疾患（例えば、慢性関節リウマチ、全身性ループスエリテマトーシスなど）、感染症（例えば、結核など）、神経変性疾患（例えば、多発性硬化症など）などの疾患の予防及び/又は治療に用いることができる。

【0015】

医薬として用いる場合には、リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグを単独で、あるいは賦形剤または担体と混合し、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤、シロップ、エアロゾル、坐剤、注射剤等に製剤化するとよい。賦形剤または担体は、当分野で常套的に使用され、医薬的に許容されるものであればよく、その種類及び組成は適宜変更される。例えば、液状担体としては水、植物油などが用いられる。固体担体としては、乳糖、白糖、ブドウ糖などの糖類、パレイショデンブ、トウモロコシデンブなどのデンブ、結晶セルロースなどのセルロース誘導体などが使用される。ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースなどの崩壊剤等を添加してもよい。その他、抗酸化剤、着色剤、矯味剤、保存剤等を添加してもよい。また、凍結乾燥製剤として用いたりすることもできる。

【0016】

リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグは、経口、経鼻、直腸、経皮、皮下、静脈内、筋肉内などの種々の経路によって投与できる。

リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの製剤中における含量は、製剤の種類により異なるが、通常1~100重量%、好ましくは50~100重量%である。例えば、液剤の場合には、リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの製剤中における含量は、1~100重量%が好ましい。カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤の場合には、リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの製剤中における含量は、通常約10~100重量%、好ましくは50~100重量%であり、残部は担体である。製剤は、単位投与製剤に製剤化するとよい。

【0017】

リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの投与量は、期待する予防及び/又は治療効果が確認できる量であればよく、剤型、投与経路、患者の年齢、体重、疾患の種類や重篤度などにより異なるが、例えば1回当たりの投与量は成人の場合、有効成分の量に換算して、300 mg/kg体重程度とし、1日に1回から数回投与することができる。

実験用試薬として用いる場合には、ビタミンD受容体を有する細胞、組織、器官又は動物個体をリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグで処理することにより、ビタミンD受容体を活性化させることができる。リトコール酸プロピ

10

20

30

40

50

オネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグは、ビタミンD受容体の活性化に有効な量で用いればよい。ビタミンD受容体を有する細胞としては、腎臓、腸管粘膜、骨髓、骨、乳腺、皮膚、神経由来の細胞などを例示することができる。また、これらの天然由来の細胞の他、ヒト胎児腎由来HEK293細胞、腸管粘膜由来HCT116細胞、SW480細胞、Caco-2細胞、骨髓由来THP-1細胞、U937細胞、HL60細胞、骨芽細胞由来MG63細胞、乳腺由来MCF-7細胞、皮膚角化細胞由来HaCaT細胞、神経由来SK-N-SH細胞、肝臓由来HepG2細胞などにビタミンD受容体遺伝子を導入した組換え細胞などを用いてもよい。ビタミンD受容体を有する組織及び器官としては、腎臓、腸管粘膜、骨髓、リンパ組織、骨、乳腺、皮膚、神経などを例示することができる。動物個体としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ニワトリなどを例示することができる。ビタミンD受容体の活性化は、VDR標的遺伝子（例えば、CYP24など）の発現誘導を測定することにより、確認することができる。

10

以下に、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに何ら影響されることはない。

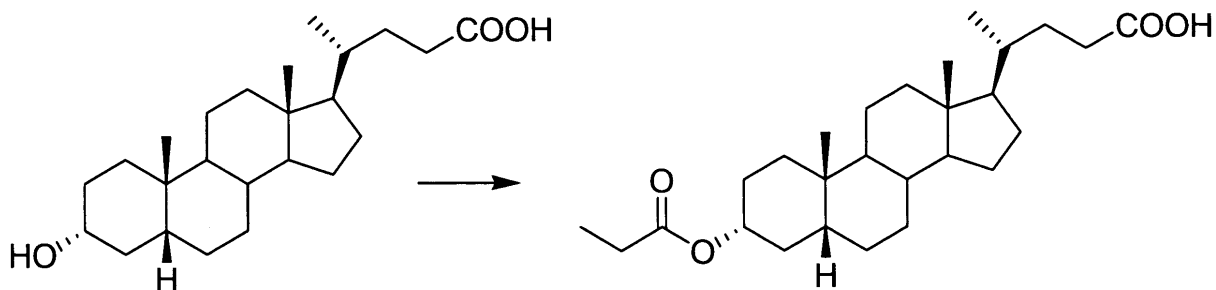
【実施例】

【0018】

〔実施例1〕

【化2】

20



30

リトコール酸 (376 mg, 1 mmol) と無水プロピオン酸 (1.3 mL) のTHF (4 mL) 溶液を0 に冷却し、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (32  $\mu\text{L}$ , 0.25 mmol) を加え、15時間加熱還流した。反応液に飽和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで抽出し、抽出液を食塩水で洗浄し、無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥後、溶媒を溜去し、残渣をカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , 15 g, 15% 酢酸エチル/ヘキサン) にて精製し、プロピオン酸エステル体 (346 mg, 80%) を得た。エステル体をベンゼン/ヘキサンで再結晶し、無色の結晶を得た。

mp 152 - 153

$^1\text{H}$  NMR ( ) 0.64 (3H, s, H-18), 0.926 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J = 5.5$  Hz, H-21), 1.13 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2.27-2.36 (3 H, m, H-23 &  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2.36-2.44 (1 H, m, H-23), 4.73 (1H, m, H-3).

40

$^{13}\text{C}$  NMR (d) 9.2, 12.0, 18.2, 20.8, 23.3, 24.1, 26.2, 26.6, 27.0, 28.0, 28.1, 30.7, 31.0, 32.2, 34.5, 35.0, 35.2, 35.7, 40.1, 40.3, 41.8, 42.7, 55.9, 56.4, 74.1, 174.1, 180.4.

MS  $m/z$  432 ( $\text{M}^+$ , 6.4), 358 (100), 343 (21), 304 (14), 257 (17), 230 (43), 215 (73).

【0019】

〔実施例2〕

文献記載の方法により (Science Vol. 284, 1999, pp1362-1365; Science Vol. 296, 2

50

002, pp.1313-1316)、リトコール酸プロピオネートのVDRに対する活性化作用を検討した。ヒト胎児腎由来HEK293細胞(独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターから入手)にCMX-GAL4-VDR発現ベクター(京都大学ウイルス研究所の梅園和彦教授(故人)から供与されたCMX-GAL4-mRXRベクターとCMX-hVDRベクターを利用して、mRXRの部分に対応するhVDRのリガンド結合領域に置き換えたもの)、MH100(UAS)x4-tk-LUCレポーターベクター(京都大学ウイルス研究所の梅園和彦教授(故人)から供与)をリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションし、8時間後に培養液中にリトコール酸プロピオネート(実施例1で調製)を加えた。16~18時間後に細胞を可溶化し、ルシフェラーゼ活性を評価した。結果を図1Aに示す。リトコール酸プロピオネートはリトコール酸アセテートよりも効果的にVDRを活性化した。

10

【0020】

〔実施例3〕

リトコール酸プロピオネートの動物への投与を行い、血漿カルシウム濃度及び臓器のVDR標的遺伝子の発現誘導効果を検討した。8~9週齢の雄マウス(C57BL/6J、日本チャールス・リバー社)へリン酸緩衝生理食塩水に溶解した化合物を隔日で腹腔内投与し、8日目に血漿及び臓器を回収し、血漿カルシウムをオルトクレゾールフタレインコンプレクソン法にて、腎臓におけるVDR標的遺伝子CYP24の発現を文献記載の方法(J Lipid Res Vol. 46, 2005, pp.46-57)にて測定した。リトコール酸プロピオネート及びリトコール酸アセテートは臓器のVDR標的遺伝子の発現を誘導した。腎臓CYP24遺伝子発現を同程度に誘導する濃度における1-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、リトコール酸プロピオネート、リトコール酸アセテートの血漿カルシウム濃度に対する影響を比較した。1-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>は高カルシウム血症を誘導したが、リトコール酸プロピオネートとリトコール酸アセテートはカルシウム濃度を変化させなかった(図2)。

20

【0021】

〔実施例4〕

文献記載の方法により(Biochem Pharmacol Vol. 57, 1999, pp521-529)、リトコール酸プロピオネートの骨髄性白血病細胞の分化誘導効果を検討した。ヒト骨髄性白血病HL60細胞(独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターから入手)に化合物を処理して、3日後に細胞のNitro blue tetrazolium還元能を評価した。リトコール酸プロピオネートはリトコール酸アセテートと同様に10 μMで弱く、また30 μMで効果的にHL60細胞の分化マーカーを誘導した(図3)

30

【0022】

〔実施例5〕

リトコール酸アセテートとリトコール酸プロピオネートのin vivo効果を検討するために、1-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>(1-(OH)D<sub>3</sub>)、リトコール酸アセテート又はリトコール酸プロピオネート(リン酸緩衝生理食塩水に溶解)をマウス(8~9週齢の雄マウス(C57BL/6J、日本チャールス・リバー社))に腹腔内投与した。1-(OH)D<sub>3</sub>は、投与後速やかに1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)に変換したが、白血病細胞を接種したマウスの生存時間を増加する効果は1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>より高かった(Honma, Y., Hozumi, M., Abe, E., Konno, K., Fukushima, M., Hata, S., Nishii, Y., DeLuca, H. F., and Suda, T. 1983. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> prolong survival time of mice inoculated with myeloid leukemia cells. Proc Natl Acad Sci USA. 80: 201-204.)。マウスに1-(OH)D<sub>3</sub>を腹腔内投与(12.5 nmol/kg)すると、体重が減少し(図4A)、血漿カルシウム濃度が増加した(図4B)。1-(OH)D<sub>3</sub>は、腎Cyp24a1、カルピンジンD<sub>9k</sub>、Trpv6及びTrpv5遺伝子の発現を効果的に誘導した(図4C)。また、1-(OH)D<sub>3</sub>は、小腸粘膜Cyp24a1発現も誘導した(図4D)。マウスをリトコール酸アセテート(0.7 mmol/kg)又はリトコール酸プロピオネート(0.7 mmol/kg)で処理しても体重は減少しなかった(図4A)。重要なことは、リトコール酸アセテート(0.7 mmol/kg)及びリトコール酸プロピオネート(0.7 mmol/kg)は、1-(OH)D<sub>3</sub>(12.5 nmol/kg)と同程度の腎Cyp24a1発現誘導効果があった(図4C)が、これらのリトコール酸誘導体は血漿カルシウム濃度を変化させなかったこと

40

50



である(図4B)。細胞内カルシウム結合タンパク質であるカルビンジン $D_{9k}$ 及びカルシウムトランスポーターであるTrpv6及びTrpv5の発現はリトコール酸誘導体によって効果的に誘導されなかった。リトコール酸アセテートとリトコール酸プロピオネートは、小腸粘膜標的遺伝子発現を誘導する効果がなかった(図4D)。

#### 【0023】

次に、リトコール酸誘導体(コーン油に溶解)の経口投与のin vivo効果を検討した。1(OH) $D_3$ を経口投与すると、体重が減少し(図5A)、血漿カルシウム濃度が増加した。しかし、リトコール酸アセテート(1 mmol/kg)又はリトコール酸プロピオネート(1 mmol/kg)は体重にも血漿カルシウムにも影響を与えなかった(図5B)。リトコール酸アセテート(0.7 mmol/kg及び1 mmol/kg)及びリトコール酸プロピオネート(0.7 mmol/kg及び1 mmol/kg)は、1(OH) $D_3$ (12.5 nmol/kg)と同程度の腎Cyp24a1発現誘導効果があった(図5C)。腎カルビンジン $D_{9k}$ の発現はリトコール酸アセテート及びリトコール酸プロピオネート処理によって誘導されなかった。1(OH) $D_3$ と異なり、リトコール酸誘導体はTrpv6及びTrpv5の発現を増加させなかった。1(OH) $D_3$ を10日間経口投与した後、小腸粘膜Cyp24a1の発現は増加しなかった(図5D)。1日の単回経口投与後に発現が観察されなかった(データを示さず)ので、10日間投与の間に誘導が見られなかったことは、以前に報告された順応機構によるのかもしれない(Lemay, J., Demers, C., Hendy, G. N., Delvin, E. E., and Gascon-Barre, M. 1995. Expression of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase gene in rat intestine: response to calcium, vitamin D<sub>3</sub> and calcitriol administration in vivo. J Bone Miner Res. 10: 1148-1157.)。小腸粘膜Cyp24a1発現に対するリトコール酸誘導体の効果は観察されたが、穏やかなものであった。従って、リトコール酸アセテートとリトコール酸プロピオネートは、体重減少及び高カルシウム血症といった毒性の効果なしに、in vivoでビタミンD受容体(VDR)を活性化することができる。

10

20

30

#### 【0024】

##### 〔製剤例1〕

リトコール酸プロピオネート 30g、結晶セルロース 140g、乳糖 100g、繊維素グリコール酸カルシウム 15g、ヒドロキシプロピルセルロース 10gおよび精製水30mlを練合機に添加し、通常の方法により5分間練合する。練合終了後、10メッシュで篩過し、乾燥機中にて50℃で乾燥する。乾燥後、整粒し、ステアリン酸マグネシウムを5g添加する。1分混合した後、打錠して、1錠当たり約100mg、直径6.5mmの錠剤を得る。この錠剤は1錠中、リトコール酸プロピオネートを10mg含有する。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

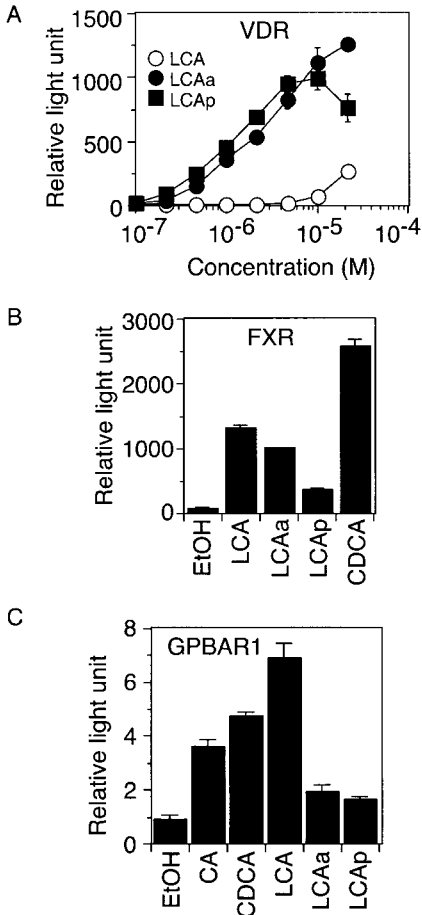
#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0025】

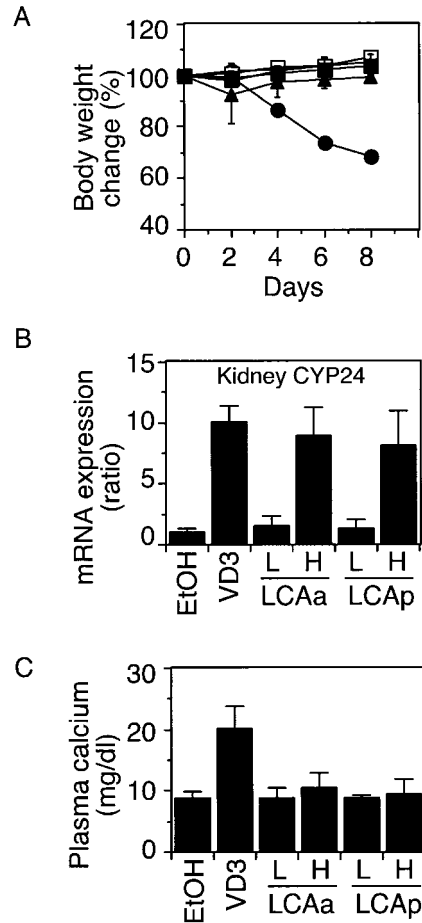
本発明は、ビタミンD受容体が関与する疾患、具体的には、骨粗鬆症、悪性新生物(例えば、骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌など)、尋常性乾癬、自己免疫疾患(例えば、慢性関節リウマチ、全身性ループスエリテマトーシスなど)、感染症(例えば、結核など)、神経変性疾患(例えば、多発性硬化症など)などの疾患の予防及び/又は治療に利用することができる。

40

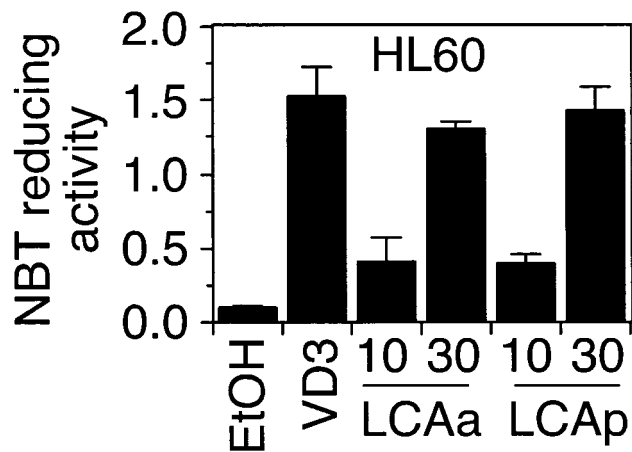
【 図 1 】



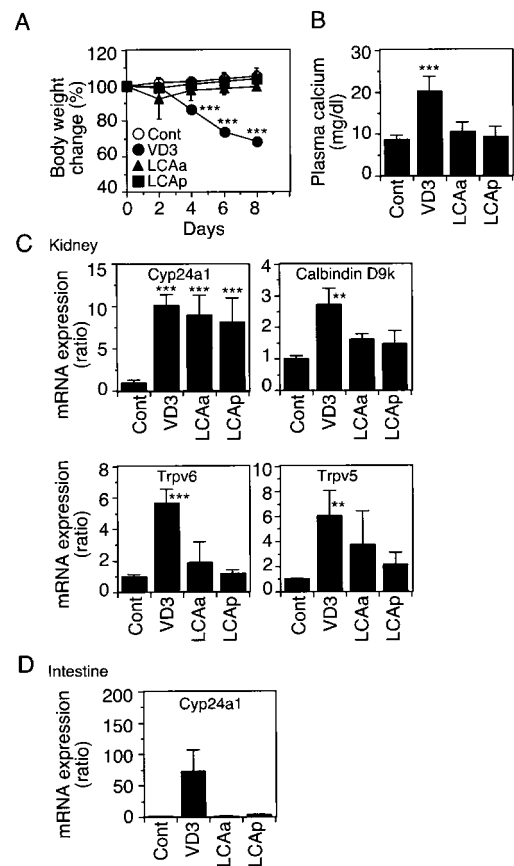
【 図 2 】



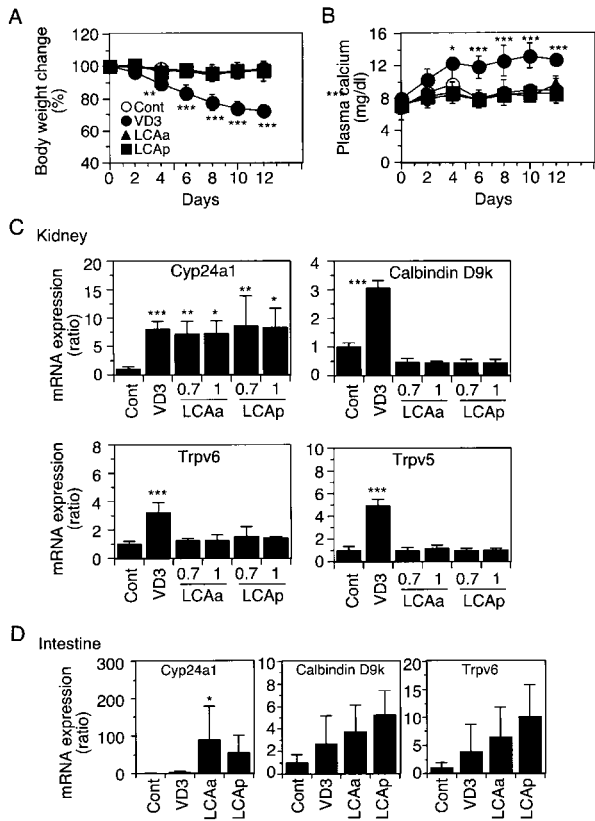
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成20年11月7日(2008.11.7)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

( 削除 )

【 請求項 2 】

ビタミンD受容体を活性化させるための組成物であって、リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグを含む前記組成物。

【 請求項 3 】

リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグを含む、医薬組成物。

【 請求項 4 】

ビタミンD受容体が発関する疾患を予防及び/又は治療するための請求項3記載の組成物。

【 請求項 5 】

骨粗鬆症、悪性新生物、尋常性乾癬、自己免疫疾患、感染症及び神経変性疾患から成る群より選択される疾患を予防及び/又は治療するための請求項3又は4記載の組成物。

【 請求項 6 】

ビタミンD受容体を有する細胞、組織、器官又は動物個体をリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグで処理することを、ビタミンD受容

体を活性化させる方法。

【請求項 7】

リトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの医薬的に有効な量を被験者に投与することを含む、ビタミンD受容体が関与する疾患を予防及び/又は治療する方法。

【請求項 8】

ビタミンD受容体を活性化させるためのリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの使用。

【請求項 9】

ビタミンD受容体が関与する疾患を予防及び/又は治療するための医薬を製造するためのリトコール酸プロピオネート、その塩、その溶媒和物又はそのプロドラッグの使用。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/050027
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07J9/00 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07J9/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	SHAIKH, et al., Synthesis and mesomorphic behaviour of lithocholic acid derivatives, Bulletin of Material Science, 2003, Vol.26, No.5, p.559-563, particularly, p.560, 2nd line from the bottom, page 561, compound (IV)	1 2-5, 9
X Y	ADACHI, R. et al., Selective activation of vitamin D receptor by lithocholic acid acetate, a bile acid derivative, Journal of Lipid Research, 2005, Vol.46, p.46-57, particularly, page 47, left column, 2nd paragraph, final five lines, page 49	1-4, 9 5
Y	NAGPAL, S. et al., Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands, Endocrine Reviews, 2005, Vol.26, No.5, p.662-687	5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 April, 2008 (01.04.08)		Date of mailing of the international search report 15 April, 2008 (15.04.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/050027

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAKISHIMA, M. et al., Vitamin D Receptor As an Intestinal Bile Acid Sensor, Science, 2002.05.17, Vol.296, p.1313-1316	1-5,9
T	ISHIZAWA, M. et al., Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators, J Lipid Res, [online] 2008.01.07, [retrieval date 2008.03.11] Internet <URL:http://www.jlr.org/cgi/reprint/M700293-J>	1-5,9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2008/050027

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 6 - 8  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
It pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/050027

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 6-8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、治療による処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2007年4月）



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 0 0 2 7									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07J9/00(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07J9/00											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2008年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2008年	日本国実用新案登録公報	1996-2008年	日本国登録実用新案公報	1994-2008年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2008年										
日本国実用新案登録公報	1996-2008年										
日本国登録実用新案公報	1994-2008年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X A	SHAIKH, et al., Synthesis and mesomorphic behaviour of lithocholic acid derivatives, Bulletin of Material Science, 2003, Vol. 26, No. 5, p. 559-563、特に p. 560 下から 2 行及び p. 561 の化合物 (IV) を参照。	1 2-5, 9									
X Y	ADACHI, R. et al., Selective activation of vitamin D receptor by lithocholic acid acetate, a bile acid derivative, Journal of Lipid Research, 2005, Vol. 46, p. 46-57、特に p.47 左欄 2 段落最後の 5 行及び p.49 などを参照。	1-4, 9 5									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 01.04.2008		国際調査報告の発送日 15.04.2008									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 恵	4 P 9164								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3492								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/050027
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	NAGPAL, S. et al., Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands, <i>Endocrine Reviews</i> , 2005, Vol.26, No.5, p.662-687	5
A	MAKISHIMA, M. et al., Vitamin D Receptor As an Intestinal Bile Acid Sensor, <i>Science</i> , 2002.05.17, Vol.296, p.1313-1316	1-5, 9
T	ISHIZAWA, M. et al., Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators, <i>J Lipid Res</i> , [online] 2008.01.07, [検索日 2008.03.11] インターネット<URL : <a href="http://www.jlr.org/cgi/reprint/M700293-J">http://www.jlr.org/cgi/reprint/M700293-J</a> >	1-5, 9

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
	A 6 1 P 25/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 松縄 学  
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

(72) 発明者 山田 幸子  
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

F ターム (参考) 4C086 AA01 AA02 DA11 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA15 ZA97 ZB07  
ZB26 ZB32 ZC41  
4C091 AA02 BB01 CC03 DD01 EE04 EE05 FF01 GG01 HH01 JJ03  
KK01 LL01 MM03 NN01 PA02 PA05 PB03 QQ01

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。