

明 細 書

発明の名称： ビタミンD誘導体の結晶又はその溶媒和物の結晶

技術分野

[0001] 本発明は、オリゴデンドロサイト分化誘導促進作用を有し、例えば多発性硬化症、多系統萎縮症、アルツハイマー型認知症、脳梗塞等の予防又は治療に有用なビタミンD誘導体の結晶又はその溶媒和物の結晶に関する。

背景技術

[0002] オリゴデンドロサイトは、神経細胞の軸索に髄鞘（ミエリン）を形成し、その主な役割は跳躍伝導の誘導による伝導速度を高めることである。加えて神経細胞の代謝にもかかわっている。

[0003] いくつかの炎症性脱髄疾患、神経変性疾患、および精神疾患においては、脱髄や髄鞘の形成不全が報告されている。脱髄とは、髄鞘が破壊され消失した状態であり、髄鞘の消失により様々な神経症状が引き起こされる。脱髄を引き起こす神経免疫疾患として多発性硬化症が著名であるが、ほかにも視神経脊髄炎、進行性多巣性白質脳症、多系統萎縮症、急性散在性脳脊髄炎、アトピー性脊髄炎、HTLV-1関連脊髄症、HIV関連白質脳症、クラッペ病等が脱髄を引き起こす中枢神経系炎症性脱髄疾患として知られている。また末梢神経系脱髄疾患としては、ギランバレー症候群、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、シャルコー・マリー・トゥース病等が知られている。さらに虚血性脳卒中では、脱髄を伴うことも多く、脱髄はその後の機能低下を引き起こす。また神経変性疾患であるアルツハイマー型認知症でも脱髄により髄鞘の可塑的変化が抑制され、認知機能の低下につながることを報告されている。

[0004] さらに髄鞘の形成不全は、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害、自閉症スペクトラム障害（ASD）、注意欠如多動性障害、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害（PTSD）、薬物依存症による抑うつ等の様々な精神疾患患者脳で確認され、疾患との関連性が指摘されている。

- [0005] 以上から、脱髄や髄鞘の形成不全の状態を正常に戻すことは、中枢神経系または末梢神経系の治療において重要である。
- [0006] 近年、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 が、オリゴデンドロサイト前駆細胞や神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化誘導の促進作用を有することが報告された（非特許文献1および2）。 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 及びその誘導体の働きには、2つの経路が知られている（非特許文献3）。一つは、核内受容体の一つであるビタミンD受容体（VDR）と結合し、遺伝子発現を制御する働き（genomic作用）である。もう一つの働きとしては、Protein disulfide isomerase A3（PDI A3）に結合し、シグナル伝達を引き起こす働き（non-genomic作用）である。現在のところ、非特許文献1および2で報告されている $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 のオリゴデンドロサイト分化誘導作用は、genomic作用とnon-genomic作用のいずれによるものなのかは、完全には明らかになっていない。一方で、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 及びその誘導体の主たる作用としてカルシウムーリン代謝作用が挙げられる。一般的に転写亢進活性値で表されるgenomic作用が強い誘導体はカルシウム代謝作用が強く、血中カルシウム濃度を上昇させ、高カルシウム血症を引き起こす恐れがある。このため、投与量に限界があり、期待する薬理作用を引き起こせない場合もある。
- [0007] さらに、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 の中枢移行性は極めて低いことが報告されている（非特許文献4および5）。これらの文献によれば、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 が脳で十分な濃度に到達するためには、極めて高い投与量を必要とすることを意味する。しかし、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 の高用量投与は、血中カルシウム濃度上昇を引き起こすため、困難である。
- [0008] それゆえ、脳において効果を発揮しうる中枢移行性に優れたビタミンD誘導体、さらにはミエリン再生促進作用と血中カルシウム上昇作用を乖離させたビタミンD誘導体が切望されるが、そのような誘導体は現在まで報告され

ていない。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1: A. G. de la Fuente et al., Journal of Cell Biology, 2015, 211 (5), 975-985

非特許文献2: H. A. Shirazi et al., Experimental and Molecular Pathology, 2015, 98 (2), 240-245

非特許文献3: M. A. Zmijewski et al., Experimental Dermatology, 2020, 29, 876-884

非特許文献4: M. R. Durk et al., The Journal of Neuroscience, 2014, 34 (21), 7091-7101

非特許文献5: E. C. Y. Chow et al., The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 2013, 304 (9), E977-989

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の目的は、優れたオリゴデンドロサイト分化誘導促進作用を有する新規のビタミンD誘導体の結晶又はその溶媒和物の結晶を提供することである。

課題を解決するための手段

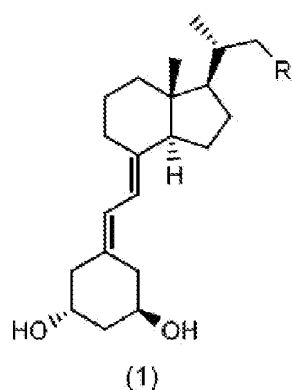
[0011] 本発明者らは上記目的で鋭意研究した結果、特定構造のビタミンD誘導体が、特に優れたオリゴデンドロサイト分化誘導促進作用を有することを見出した。

さらに本発明者らは、それらの化合物の一部に、化学的に安定であり、かつ医薬原薬として適した構造の結晶を見出した。

[0012] すなわち本発明は、式（１）で表されるビタミンＤ誘導体の結晶又はその溶媒和物の結晶である。

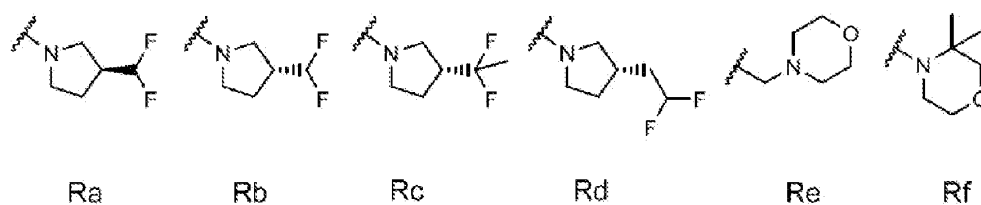
式（１）：

[化1]



[式中、Rは、下記式におけるR a、R b、R c、R d、R e、またはR fのいずれかの構造を表す。]

[化2]



発明の効果

[0013] 本発明により、優れたオリゴデンドロサイト分化誘導促進作用を有し、例えば多発性硬化症、多系統萎縮症、アルツハイマー型認知症、脳梗塞等の予防又は治療に有用なビタミンＤ誘導体の結晶又はその溶媒和物の結晶が提供される。

本発明の結晶は、医薬品製造用原体として用いることができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((S) - 3 - (ジフルオロメチル) ピロリジン-1-イル) プロパン-2-イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ-4 H-インデン-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物A) の結晶の粉末X線回折スペクトルである。

[図2]図2は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (ジフルオロメチル) ピロリジン-1-イル) プロパン-2-イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ-4 H-インデン-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物B) の結晶の粉末X線回折スペクトルである。

[図3]図3は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (1, 1-ジフルオロエチル) ピロリジン-1-イル) プロパン-2-イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ-4 H-インデン-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物C) の結晶の粉末X線回折スペクトルである。

[図4]図4は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((S) - 3 - (2, 2-ジフルオロエチル) ピロリジン-1-イル) プロパン-2-イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ-4 H-インデン-4-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物D) の結晶の粉末X線回折スペクトルである。

[図5]図5は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 7 a - メチル-1 - ((R) - 4 - モルホリノブタン-2-イル) オクタヒドロ-4 H-インデン-4-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物E) の結晶の粉末X線回折スペクトルである。

[図6]図6は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - (3, 3-ジメチルモルホリノ) プロパン-2-イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ-4 H-インデン-4-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物F) の結晶の粉末X線回折

スペクトルである。

[図7]図7は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((S) - 3 - (ジフルオロメチル) ピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物A) の結晶の固体NMR (^{13}C) スペクトルである。

[図8]図8は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (ジフルオロメチル) ピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物B) の結晶の固体NMR (^{13}C) スペクトルである。

[図9]図9は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (1, 1 - ジフルオロエチル) ピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物C) の結晶の固体NMR (^{13}C) スペクトルである。

[図10]図10は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((S) - 3 - (2, 2 - ジフルオロエチル) ピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物D) の結晶の固体NMR (^{13}C) スペクトルである。

[図11]図11は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 7 a - メチル - 1 - ((R) - 4 - モルホリノブタン - 2 - イル) オクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物E) の結晶の固体NMR (^{13}C) スペクトルである。

[図12]図12は、(1 R、3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - (3, 3 - ジメチルモルホリノ) プロパン - 2 -

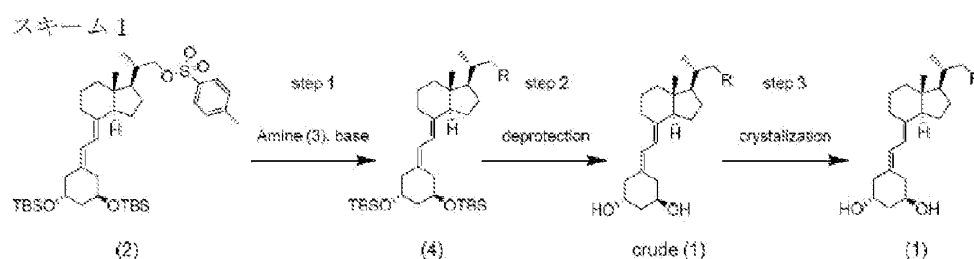
イル)－7 a－メチルオクタヒドロ－4 H－インデン－4－イリデン)エチリデン)シクロヘキサン－1, 3－ジオール(化合物F)の結晶の固体NMR (^{13}C) スペクトルである。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の上記式(1)で表されるビタミンD誘導体の結晶の製造について説明する。

[0016] 上記式(1)で表されるビタミンD誘導体の合成はいかなる方法で行ってもよい。例えば上記式(1)においてR=R a、R b、R c、R d、またはR fであるビタミンD誘導体は、スキーム1の手順で合成することができる。すなわち、工程1(図中step 1)として化合物(2)と環状アミン化合物(3)(図中Amine (3))を塩基存在下でカップリングさせて化合物(4)を取得した後、工程2(図中step 2)としてヒドロキシ基の保護基を脱保護し精製することで粗体の化合物(1)[R=R a、R b、R c、R d、またはR f](図中crude (1))を得ることができる。工程3(図中step 3)として、粗体の化合物(1)(図中crude (1))を再結晶化することで、目的とする化合物(1)を得ることができる。

[0017] [化3]



[0018] 化合物(2)とカップリング反応(工程1、図中Step 1)を行う環状アミン化合物(3)は、フリー体であっても塩を用いてもかまわない。本反応で使用する環状アミン化合物(3)の量は、化合物(2)の1～5モル当量、好ましくは3～5モル当量添加するのがよい。また本工程における塩基は特に限定しないが、好ましい塩基として炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、および炭酸セシウム等を挙げることができる。塩基は化合物(2)の1～

5モル当量、好ましくは3～5モル当量添加するのがよい。また本反応を加速させるために、反応混合物にヨウ化カリウム、またはヨウ化ナトリウムを添加してもよい。ヨウ化カリウム、またはヨウ化ナトリウムの添加量としては、化合物(2)の1～2モル当量が好ましい。また溶媒についても特に限定しないが、好ましい溶媒としてN,N-ジメチルホルムアミド、N-メチル-2-ピロリドン等を挙げることができる。また本カップリング反応の反応温度は40℃～90℃で、反応時間としては6時間から48時間反応させることが好ましい。

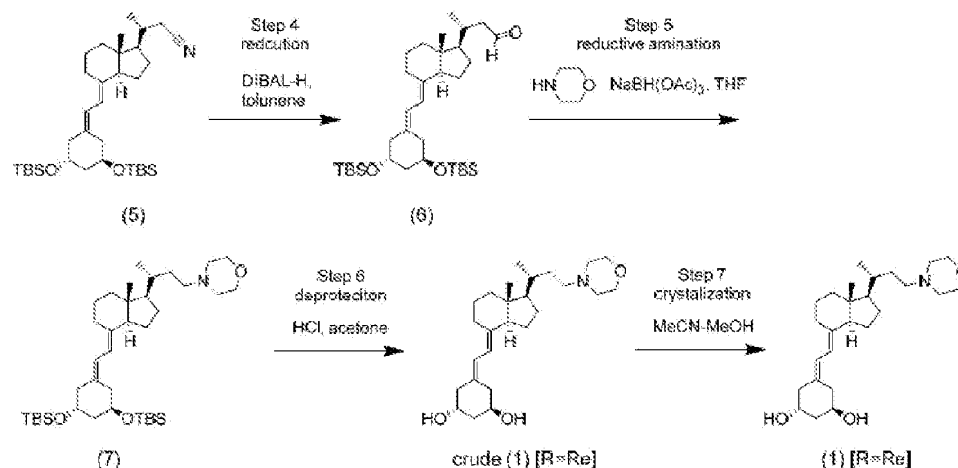
[0019] なお、工程1の完了後に精製したうえで脱保護反応(工程2、図中Step 2)に進んでもよいし、もしくは工程1の粗体で脱保護反応(工程2)に進んでもかまわない。工程1後に精製する場合には、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製するのが好ましい。シリカゲルカラムクロマトグラフィー精製の溶媒としては、ヘプタン/酢酸エチル、またはヘキサン/酢酸エチルの混合溶媒で精製するのがよい。

[0020] 上記スキーム1中の脱保護反応(工程2)の条件としては、シリル系保護基の脱保護条件であれば特に限定しないが、テトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)による脱保護や塩酸による脱保護を挙げることができる。好ましい条件としては、テトラヒドロフラン(THF)中、テトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)を化合物(2)(工程1後に精製した場合は化合物(3))の1ヒドロキシ基あたり1～3モル当量加えて、室温から還流温度で攪拌することが挙げられる。また別の好ましい条件として、アセトンや2-ブタノン等の溶媒中、塩酸を化合物(2)(工程1後に精製した場合は化合物(3))の1ヒドロキシ基あたり1～3モル当量加えて、室温で攪拌することが挙げられる。塩酸の濃度は1M～6Mが好ましい。

[0021] また、上記式(1)においてR=R_eであるビタミンD誘導体は、下記スキーム2のようにして合成することができる。

[化4]

スキーム 2



[0022] すなわち、公知化合物（５）を水素化ジイソブチルアルミニウムで還元（ＤＩＢＡＬ還元）してアルデヒド体（６）を取得（工程４、図中step 4）したのち、還元的アミノ化によりモルホリンを導入して化合物（７）を取得し（工程５、図中step 5）、脱保護することで粗体の化合物（１）〔 $R=Re$ 〕（図中crude（１）〔 $R=Re$ 〕）を得る（工程６、図中step 6）ことができる。

[0023] 工程４のＤＩＢＡＬ還元は、 $-78^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$ 下で、トルエン中、化合物（５）の１～２モル当量のジイソブチルアルミニウムヒドريد（ＤＩＢＡＬ－Ｈ）を加えることで、０．５～２時間程度で反応が進行する。

[0024] 工程５の還元的アミノ化試薬としては、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム等が好ましい。溶媒は特に限定しないが、好ましい溶媒としてテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）を挙げることができる。またモルホリンを溶媒として反応させることでも構わない。還元的アミノ化反応は、例えばＴＨＦ中、化合物（６）に対して、１～５モル当量のモルホリンと、１～３モル当量の還元剤を反応させることで反応が進行する。その後、脱保護反応（工程６）を行うことで粗体の化合物（１）〔 $R=Re$ 〕（図中、crude（１）〔 $R=Re$ 〕）を得ることができる。

工程6の脱保護反応については、スキーム1と同様の条件で進行する。

[0025] 粗体の化合物(1) [R=Re] (図中、*c r u d e* (1) [R=Re]) を得るための途中の中間体である化合物(4)、化合物(6)、化合物(7)は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してもよいし、精製せずに次工程にすすんでもよい。中間体で精製する場合、シリカゲルカラムクロマトグラフィーの移動溶媒としてはヘプタン、酢酸エチルを用いるのが好ましい。具体的には、例えばヘプタン／酢酸エチル=98／2からヘプタン／酢酸エチル=70／30まで酢酸エチルの比率をグラジエントにあけて精製することで、中間体を精製することができる。

[0026] 本発明の結晶は、上記製法により得た式(1)の粗体の化合物(1)を再結晶することにより得ることができる(上記スキーム1における工程3、または上記スキーム2における工程7)。再結晶溶媒は、例えばアセトニトリル、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、アセトン、水を挙げることができる。好ましい溶媒として、アセトニトリル、メタノール、エタノール、水を挙げることができる。再結晶の溶媒量としては、粗体重量の10倍～100倍(v/w)を挙げることができる。製法としては、粗体に再結晶溶媒を加えて40℃～70℃、好ましくは45℃～65℃に加熱し溶解させたのちに、室温または0℃まで冷却することより結晶を生成することができる。

[0027] また、上記製法により得た式(1)の粗体の化合物(1)を中和晶析することでも、本発明の結晶を取得することができる。具体的には、式(1)の粗体の化合物(1)に塩酸を加えることで塩酸塩溶液とし、式(1)の粗体の化合物(1)の塩酸塩溶液を氷冷下で攪拌しつつ、ここに塩基を添加してpHを7.5～11程度、好ましくは8～10程度にすることで、上記式(1)で表されるビタミンD誘導体の結晶を得ることができる。塩酸塩溶液を調製する際は、1～6Mの塩酸を用いるが、好ましくは1～2Mの塩酸を挙げることができる。また中和時の塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、または炭酸水

素ナトリウム等の水溶液を用いて行うが、好ましい塩基としては、1～5 Mの水酸化ナトリウム水溶液を挙げることができる。中和は0℃から室温、好ましくは0～20℃、又は0～10℃の温度で、塩基を滴下して行うことができる。中和後、0℃から室温、好ましくは10～35℃、又は20～30℃の温度で30分から3時間攪拌した後、ろ過、乾燥することで、目的とする上記式(1)で表されるビタミンD誘導体の結晶を得ることができる。

[0028] 上記再結晶や中和晶析によって取得した結晶が医薬品として用いるのに好ましい純度でなかった場合には、その低純度の結晶をスラリー状態で加熱攪拌することで、LC純度を上げることができる。スラリー状態での攪拌に用いる溶媒は特に限定しないが、アセトニトリル、メタノール、エタノール、水を挙げることができる。また、攪拌温度は、室温から60℃が好ましい。一般には、当該低純度の結晶が完全には溶解しない溶媒量、温度下で加熱攪拌し、室温または0℃まで冷却後に、結晶をろ過することで純度を向上させることができる。

なお、上記の再結晶や中和晶析によって得られる結晶の一部が、化合物(1)と再結晶溶媒等の溶媒との溶媒和物として存在していてもよい。

[0029] 本発明の結晶は、粉末X線回折(XRD)スペクトル、示差走査熱量分析(DSC)および／または固体NMRスペクトル等によって特徴付けられる。これらの結晶の粉末X線回折(XRD)スペクトルは特徴的なパターンを示し、それぞれの結晶は特異的な回折角 2θ の値を有する。これらの結晶は示差走査熱量分析(DSC)においても、それぞれに特徴的な熱挙動を示す。これら結晶の固体NMRスペクトルは特徴的なパターンを示し、それぞれの結晶は特異的な化学シフト(ppm)を有する。

[0030] 本発明は、前記式(1)で表される化合物の結晶であるが、以下、その好適な実施形態として、各化合物の結晶について以下に記載する。

[0031] <化合物名>

(1R, 3R) - 5 - (2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 1 - ((S) - 1 - ((S) - 3 - (ジフルオロメチル)ピロリジン-1-イル)プロ

パン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1,3-ジオール(化合物(A))

(1R,3R)-5-(2-((1R,3aS,7aR,E)-1-((S)-1-((R)-3-(ジフルオロメチル)ピロリジン-1-イル)プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1,3-ジオール(化合物(B))

(1R,3R)-5-(2-((1R,3aS,7aR,E)-1-((S)-1-((R)-3-(1,1-ジフルオロエチル)ピロリジン-1-イル)プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1,3-ジオール(化合物(C))

(1R,3R)-5-(2-((1R,3aS,7aR,E)-1-((S)-1-((S)-3-(2,2-ジフルオロエチル)ピロリジン-1-イル)プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1,3-ジオール(化合物(D))

(1R,3R)-5-(2-((1R,3aS,7aR,E)-7a-メチル-1-((R)-4-モルホリノブタン-2-イル)オクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1,3-ジオール(化合物(E))

(1R,3R)-5-(2-((1R,3aS,7aR,E)-1-((S)-1-(3,3-ジメチルモルホリノ)プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1,3-ジオール(化合物(F))

[0032] 化合物(A)の結晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、 $2\theta = 14.2^\circ$ 、 16.3° 、 17.9° 、および 18.5° に特徴的なピークを有し、より詳細には、 8.9° 、 14.2° 、 16.3° 、 17.9° 、および 18.5° に特徴的なピークを有する。化合物(A)の結晶は、示差走査熱

量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 171℃ の吸熱ピークを有する。また化合物 (A) の結晶は、 ^{13}C 固体 NMR スペクトルにおいて、13.6 ppm、19.2 ppm、117.2 ppm、121.8 ppm、133.6 ppm、および 138.5 ppm の特徴的な化学シフトを有する。

[0033] 化合物 (B) の結晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、 $2\theta = 14.2^\circ$ 、 16.2° 、 17.9° 、 18.5° 、および 24.3° に特徴的なピークを有し、より詳細には、 8.9° 、 14.2° 、 16.2° 、 17.9° 、 18.5° 、 24.3° および 30.4° に特徴的なピークを有する。化合物 (B) の結晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 187℃ の吸熱ピークを有する。また化合物 (B) の結晶は、 ^{13}C 固体 NMR スペクトルにおいて、13.1 ppm、19.7 ppm、117.1 ppm、123.2 ppm、132.6 ppm、および 139.2 ppm の特徴的な化学シフトを有する。

[0034] 化合物 (C) の結晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、 $2\theta = 14.1^\circ$ 、 15.2° 、 15.8° 、 16.6° 、および 18.8° に特徴的なピークを有し、より詳細には、 14.1° 、 15.2° 、 15.8° 、 16.6° 、 17.2° 、 18.8° 、 21.3° および 22.6° に特徴的なピークを有する。化合物 (C) の結晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 159℃ の吸熱ピークを有する。また化合物 (C) の結晶は、 ^{13}C 固体 NMR スペクトルにおいて、16.6 ppm、18.0 ppm、118.1 ppm、120.4 ppm、137.2 ppm、および 138.8 ppm の特徴的な化学シフトを有する。

[0035] 化合物 (D) の結晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、 $2\theta = 14.6^\circ$ 、 16.2° 、 16.5° 、および 18.3° に特徴的なピークを有し、より詳細には、 12.4° 、 14.6° 、 16.2° 、 16.5° および 18.3° に特徴的なピークを有する。化合物 (D) の結晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 171℃ の吸熱ピークを有する。また化合物 (D) の結晶は、 ^{13}C 固体 NMR スペクトルにおいて、13

. 0 ppm、18.6 ppm、116.6 ppm、123.6 ppm、132.5 ppm、および141.1 ppmの特徴的な化学シフトを有する。

[0036] 化合物（E）の結晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、 $2\theta = 13.5^\circ$ 、 16.4° 、 18.1° 、および 20.3° に特徴的なピークを有し、より詳細には、 13.5° 、 16.4° 、 16.7° 、 18.1° および 20.3° に特徴的なピークを有する。化合物（E）の結晶は、示差走査熱量分析（DSC）において、補外開始点温度が 194°C の吸熱ピークを有する。また化合物（E）の結晶は、 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、14.3 ppm、19.4 ppm、117.4 ppm、122.2 ppm、133.2 ppm、および139.6 ppmの特徴的な化学シフトを有する。

[0037] 化合物（F）の結晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、 $2\theta = 16.1^\circ$ 、 16.4° 、および 17.3° に特徴的なピークを有し、より詳細には、 13.7° 、 15.3° 、 16.1° 、 16.4° 、 17.3° 、 19.1° および 19.6° に特徴的なピークを有する。化合物（F）の結晶は、示差走査熱量分析（DSC）において、補外開始点温度が 218°C の吸熱ピークを有する。また化合物（F）の結晶は、 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、13.4 ppm、14.2 ppm、18.3 ppm、117.4 ppm、123.0 ppm、132.6 ppm、および140.0 ppmの特徴的な化学シフトを有する。

[0038] ここで「特徴的なピーク」とは各々の結晶形の粉末X線回折スペクトル、および固体NMRスペクトルにおいて、それぞれのスペクトル全体のパターンを特徴づける固有のピークを意味する。本発明の回折角、または化学シフトで特定される結晶には、上記の特徴的なピーク以外のピークを認めるものも含まれる。

[0039] 粉末X線回折スペクトルにおける回折角 2θ の位置および相対強度は測定条件によって多少変動しうるものであるため、 2θ がわずかに異なる場合であっても、適宜スペクトル全体のパターンを参照して結晶形の同一性は認定されるべきであり、かかる誤差の範囲の結晶も本発明に含まれる。 2θ の誤

差としては、例えば、 $\pm 0.2^\circ$ が考えられる。すなわち、上記回折角で特定される結晶には、 $\pm 0.2^\circ$ の範囲で一致するものも含まれる。粉末X線回折法を用いた結晶形態の同一性の判断に当たっては、少ないピーク数であっても、 $\pm 0.2^\circ$ 以内の誤差で一致するピークが複数確認されれば同一の結晶と判断できることもある。錠剤等の混合物を含む物を用いて分析する場合は、原薬粉体を分析試料とした場合に対し、錠剤等に含まれる賦形剤等の多成分のピークも混在することとなる結果、複数成分によるピークの重なりで判別できないピークが生じることもあるため、なおさら $\pm 0.2^\circ$ 以内の誤差で一致するピークが複数確認されれば同一の結晶と判断することが適切である。

[0040] また、粉末X線回折スペクトルの測定条件（例えば、装置）に由来する誤差の範囲の結晶も本発明に含まれる。示差走査熱量分析（DSC）において、ピークの補外開始点温度とは、発熱または吸熱ピークの開始点の温度であり、外挿により求めた発熱または吸熱開始温度を言う。示差走査熱量分析（DSC）における発熱および吸熱ピークも測定条件によって多少変動しうる。誤差としては、例えば $\pm 5^\circ\text{C}$ 、 $\pm 2^\circ\text{C}$ の範囲が考えられる。すなわち、上記ピークで特定される結晶は、 $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内乃至 $\pm 5^\circ\text{C}$ 以内の範囲で一致するものも含まれる。

[0041] 一般に、 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおける化学シフトも、誤差が生じるものである。かかる誤差としては、例えば、 $\pm 0.25\text{ ppm}$ 、典型的には、 $\pm 0.5\text{ ppm}$ の範囲である。すなわち、上記化学シフトで特定される結晶形は、 $\pm 0.25\text{ ppm}$ 以内乃至 $\pm 0.5\text{ ppm}$ 以内の範囲で一致するものも含まれる。また、測定時の回転周波数や測定機器の相違により、ピーク強度が変化したり、ピークが出現したりまたは消滅することがある。固体NMRスペクトルを用いた結晶形態の同一性の判断に当たっては、少ないピーク数であっても、 $\pm 0.25\text{ ppm}$ 以内（場合によっては $\pm 0.5\text{ ppm}$ 以内）の誤差で一致するピークが複数確認されれば同一の結晶と判断できることもある。錠剤等の混合物を含む物を用いて分析する場合は、原薬粉体を分

析試料とした場合に対し、錠剤等に含まれる賦形剤等の多成分のピークも混在することとなる結果、複数成分によるピークの重なりで判別できないピークが生じることもあるため、なおさら±0.25 ppm以内（場合によっては±0.5 ppm以内）の誤差で一致するピークが複数確認されれば同一の結晶と判断することが適切である。

- [0042] さらに、粉末X線回折スペクトル、示差走査熱量分析（DSC）および¹³C固体NMRスペクトルのいずれの分析結果の値についても、結晶の標準品、例えば本願実施例記載の方法により得られた各結晶の実測値と、本願に記載の各分析結果の数値の差も、測定誤差として許容される。すなわち、かかる方法により算出された誤差範囲内で、回折角、吸熱および発熱ピークが一致する結晶も本発明の結晶に含まれる。
- [0043] 錠剤等の混合物を含む物を用いて分析する場合、原薬粉体を分析試料とした場合に対し、ピーク強度は小さくなる傾向がある。そのため、混合物における結晶形の同一性の分析を固体NMRやXRDで行う場合には、測定時間を延ばして測定してもよく、積算回数を増やすことも有用である。
- [0044] 本発明において、式（1）で表されるビタミンD誘導体の結晶、またはその溶媒和物の結晶は、結晶でないものに比べ、製造時または保存時の取り扱いや安定性などが有利となる。
- [0045] 本発明の式（1）で表されるビタミンD誘導体の結晶、またはその溶媒和物の結晶は、再髄鞘化促進剤として臨床で応用可能な、多発性硬化症、視神経脊髄炎、進行性多巣性白質脳症、多系統萎縮症、急性散在性脳脊髄炎、アトピー性脊髄炎、HTLV-1関連脊髄症、HIV関連白質脳症、クラッペ病、ギランバレー症候群、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、シャルコー・マリー・トゥース病、パーキンソン病、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害、自閉症スペクトラム障害、注意欠如多動性障害、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、薬物依存症による抑うつ、自閉症、アルツハイマー型認知症、および虚血性脳卒中などの、脱髄または髄鞘形成不全に関連する疾患の治療剤として使用することができる。

- [0046] 本発明のビタミンD誘導体の結晶、またはその溶媒和物の結晶を有効成分として含有する治療剤は、通常製剤化に用いられる担体や基剤および賦形剤、その他添加剤を用いて医薬組成物に調製される。医薬組成物に用いられる担体、基剤および賦形剤としては、固体または液体のいずれでもよく、例えば、乳糖、ステアリン酸マグネシウムスターチ、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ごま油、カカオバター、エチレンジグリコール、および中鎖脂肪酸トリグリセリド等やその他常用のものが挙げられる。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、ソフトカプセル剤、顆粒剤、散剤、および液剤等による経口投与、あるいは静注、および筋注等の注射剤、坐剤、経皮、および経鼻等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。
- [0047] 本発明の治療剤における有効成分の治療又は予防のための有効量は、投与経路、患者の年齢、性別、疾患の程度によって異なるが、通常、0.1～10000 μg /日程度であり、投与回数は通常1～3回/日ないし1～3回/週であり、このような条件を満足するように製剤を調製するのが好ましい。ただし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

実施例

- [0048] 以下、本開示に係る実施例を挙げて具体的に説明する。ただし、以下の実施例は本発明を限定するものではない。例えば、以下の実施例で例示する化合物の合成方法、精製方法および結晶化方法は、本発明の結晶を得るための方法例示であり、本発明の結晶が以下に開示する合成方法、精製方法および結晶化方法によってのみ得られた結晶に限定されるものではない。
- [0049] 実施例の結晶に係る化合物および合成の際に単離された新規化合物の構造は、 ^1H -NMRスペクトルまたはLC/MS（液体クロマトグラフ/質量分析計）を用いる質量分析法により確認した。
- [0050] ^1H -NMRスペクトルについては、JEOL JNM-ECZ400S（400MHz）を用いた。溶媒が CDCl_3 の場合はテトラメチルシランのピ

ーク (0.0 ppm) またはクロロホルムのピーク (7.26 ppm) を、
CD₃ODの場合はメタノールのピーク (3.30 ppm) を標準ピークとして用いた。¹H-NMRスペクトル (400 MHz、CD₃OD、またはCDCl₃) については、その化学シフト (δ : ppm) およびカップリング定数 (J: Hz) を示す。なお、以下の略号はそれぞれ次のものを表す。s=singlet、d=doublet、t=triplet、q=quartet、brs=broad singlet、m=multiplet。

[0051] LC/MSの結果については、各化合物の [M+H]⁺ の値 (分子量実測値 (Obs. MS) : すなわち化合物の分子質量 [M] にプロトン [H]⁺ が付加した実測値) を示す。

[0052] 実施例に係る結晶の粉末X線回折スペクトルは、以下の条件で測定した。

装置: リガク製 MiniFlex 600-C、線源: Cu·K α 、波長: 1.541862 (10⁻¹⁰m)、管電圧-管電流: 40 kV-15 mA、検出器: 高速1次元検出器 D/tex Ultra 2、スキャン範囲: 3~40°、ステップ条件: 0.01°、測定速度: 毎分10°、DS: 1/4°、IHS: 10 mm、入射・受光ソーラースリット: 2.5°、K β フィルター (Ni)

[0053] 実施例に係る示差走査熱量は、以下の条件で測定した。

装置: TAインスツルメント製 Q-200、昇温速度: 毎分5°C、雰囲気: ヘリウム、サンプルパン: アルミニウム、測定温度範囲: 40~250°C

実施例に係る結晶の固体NMRスペクトル (¹³C) は、以下の条件で測定した。

装置: ブルカーバイオスピン社製 Avance III 500 (MASローター: 3.2 mm Φ)

測定核: ¹³C

観測周波数: 125.8 MHz

測定モード: VCAP/MAS

MAS回転数: 12 kHz

コンタクトタイム：2ミリ秒

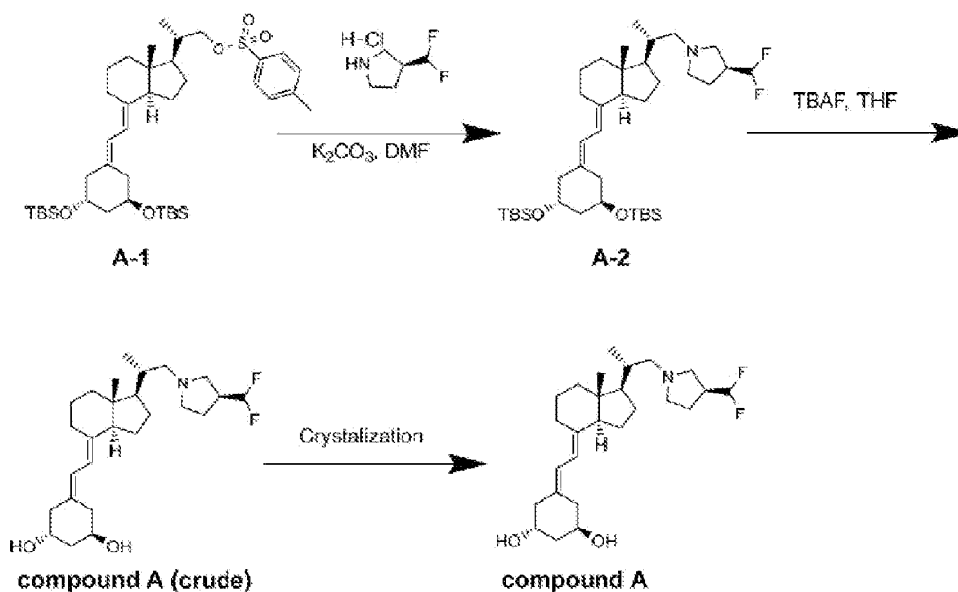
パルス繰り返し時間：5秒

外部標準物質：グリシン（ α 型結晶）（ α 型結晶のグリシンのカルボニルピークを176.03 ppmと設定して測定し、トリメチルシラン（TMS）のピークを0 ppmとした）

[0054] [实施例 1]

(1 R, 3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((S) - 3 - (ジフルオロメチル) ピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物 (A)) の結晶の製造

[0055] [化5]



[0056] <工程 1（ピロリジン環の導入）>

公知化合物である (S) - 2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 4 - (2 - ((3 R, 5 R) - 3, 5 - ビス ((t - ブチルジメチルシリル) オキシ) シクロヘキシリデン) エチリデン) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イル) プロピル 4 - メチルベンゼンスルホネート (C A

S No. 1621978-74-2、化合物(A-1)、図中A-1)
 [8.45 g、11.8 mmol]と公知化合物である(3S)-3-(ジフルオロメチル)ピロリジン塩酸塩(CAS No. 1638744-40-7) [3.00 g、19.0 mmol]と炭酸カリウム[6.51 g、47.1 mmol]の混合物のDMF溶液[100 mL]を60℃で24時間加熱攪拌した。混合物を水[250 mL]に移し、酢酸エチル[200 mL]で抽出した。有機相を飽和食塩水[100 mL]で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘプタン/酢酸エチル系]で精製し、(S)-1-((S)-2-((1R, 3aS, 7aR, E)-4-(2-((3R, 5R)-3, 5-ビス((t-ブチルジメチルシリル)オキシ)シクロヘキシリデン)エチリデン)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル)プロピル)-3-(ジフルオロメチル)ピロリジン(化合物(A-2)、図中A-2) [4.75 g、7.13 mmol]を得た。

[0057] <工程2 (脱保護)>

化合物(A-2) [4.75 g、7.13 mmol]のTHF溶液[60 mL]にTBAF[1M THF溶液、22 mL、22 mmol]を室温で加えて、混合物を5時間還流した。混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液[100 mL]に移し、酢酸エチル[100 mL]で抽出した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮することで、粗体の(1R, 3R)-5-(2-((1R, 3aS, 7aR, E)-1-((S)-1-((S)-3-(1, 1-ジフルオロエチル)ピロリジン-1-イル)プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1, 3-ジオール(化合物(A) (crude)、図中compound A (crude))を得た。

Exact Mass = 437.31 (C₂₆H₄₁F₂NO₂) Obs.
 mass = 438.35 (M+H)

[0058] <工程3 (結晶化)>

工程2で得た粗体（化合物（A）（c r u d e））にアセトニトリル〔90 mL〕とメタノール〔10 mL〕の混合溶媒を加えて、オイルバス中50℃で攪拌した。粗体が溶解したことを確認した後に加熱を停止し、オイルバス中で室温まで冷却させることで結晶が析出した。結晶を回収し、（1R, 3R）-5-（2-（（1R, 3a S, 7a R, E）-1-（（S）-1-（（S）-3-（1, 1-ジフルオロエチルピロリジン-1-イル）プロパン-2-イル）-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン）エチリデン）シクロヘキサン-1, 3-ジオール（化合物（A）、図中 compound A）〔1.86 g、4.25 mmol〕の結晶を得た。

[0059] $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 6.21 (1H, d, $J = 10.7$ Hz), 5.89 (1H, d, $J = 10.7$ Hz), 5.78 (1H, td, $J = 57.0, 6.0$ Hz), 4.06–3.95 (2H, m), 2.82 (2H, dd, $J = 18.8, 10.0$ Hz), 2.66–2.50 (4H, m), 2.44–1.92 (11H, m), 1.86–1.23 (13H, m), 1.05 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 0.60 (3H, s).

Exact Mass = 437.31 ($\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{F}_2\text{NO}_2$) Obs.

mass = 438.35 (M+H)

[0060] <化合物（A）の結晶の評価>

得られた化合物（A）の結晶のXRDを図1に示す。回折角 $2\theta = 8.9^\circ$ 、 14.2° 、 16.3° 、 16.6° 、 17.9° 、 18.5° 、 20.1° 、 22.6° 、 22.9° 、および 30.3° にピークが確認された。

[0061] 化合物（A）の結晶の示差走査熱量分析（DSC）における吸熱ピークの補外開始点温度は 171°C であった。

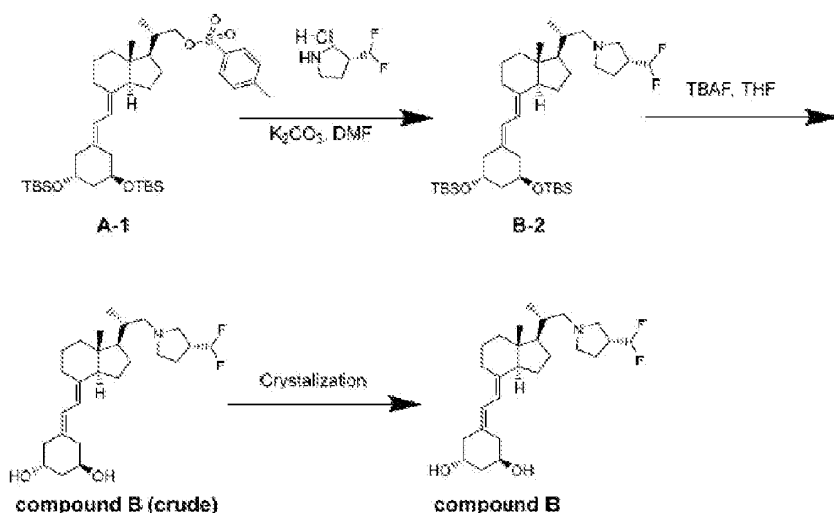
[0062] 得られた化合物（A）の結晶の ^{13}C 固体NMRスペクトルを図7に示す。化学シフト13.6 ppm、19.2 ppm、22.9 ppm、29.4 p

ppm、46.0 ppm、57.2 ppm、65.8 ppm、67.5 ppm、117.2 ppm、121.8 ppm、133.6 ppm、および138.5 ppmにピークが確認された。

[0063] [実施例2]

(1R, 3R) - 5 - (2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (ジフルオロメチル) ピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7a - メチルオクタヒドロ - 4H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物 (B)) の結晶の製造

[0064] [化6]



[0065] <工程1 (ピロリジン環の導入)>

公知化合物である (S) - 2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 4 - (2 - ((3R, 5R) - 3, 5 - ビス ((t - ブチルジメチルシリル) オキシ) シクロヘキシリデン) エチリデン) - 7a - メチルオクタヒドロ - 1H - インデン - 1 - イル) プロピル 4 - メチルベンゼンスルホネート (CAS No. 1621978-74-2、化合物 (A-1)、図中A-1) [4.95 g、6.90 mmol] と公知化合物である (3R) - 3 - (ジフルオロメチル) ピロリジン 塩酸塩 (CAS No. 1443983-

89-8) [2.26 g, 14.3 mmol] と炭酸カリウム [4.97 g, 36.0 mmol] の混合物のDMF溶液 [49.5 mL] を60℃で22時間加熱攪拌した。混合物を飽和食塩水 [100 mL] に移し、酢酸エチル [100 mL] で抽出した。有機相を飽和食塩水 [100 mL] で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘプタン/酢酸エチル系] で粗精製し、(R)-1-((S)-2-((1R, 3aS, 7aR, E)-4-(2-((3R, 5R)-3, 5-ビス((t-ブチルジメチルシリル)オキシ)シクロヘキシリデン)エチリデン)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル)プロピル)-3-(ジフルオロメチル)ピロリジン (化合物(B-2)、図中B-2) [1.93 g, 2.90 mmol] を得た。

[0066] <工程2 (脱保護)>

化合物(B-2) [1.93 g, 2.90 mmol] のTHF溶液 [26 mL] にTBAF [1M THF溶液、8.7 mL, 8.7 mmol] を室温で加えて、混合物を60℃で4.5時間攪拌した。混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 [100 mL] に移し、酢酸エチル [100 mL, 2回] で抽出した。有機相から1M塩酸 [100 mL] で逆抽出した。水相を5M水酸化ナトリウム水溶液 [20 mL] で中和し、さらに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 [20 mL] を加えると、白色懸濁液になった。この混合物を酢酸エチル [100 mL] で抽出し、有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮することで、粗体の(1R, 3R)-5-(2-((1R, 3aS, 7aR, E)-1-((S)-1-((R)-3-(1, 1-ジフルオロエチル)ピロリジン-1-イル)プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物(B) (crude)、図中compound B (crude)) [1.67 g] を得た。

Exact Mass = 437.31 (C₂₆H₄₁F₂NO₂) Obs.

mass = 438.35 (M+H)

[0067] <工程3 (結晶化)>

工程2で得た粗体(化合物(B) (c r u d e)) [1. 6 7 g] にアセトニトリル [3 6 m L] とメタノール [4 m L] の混合溶媒を加えて、オイルバス中6 0℃で攪拌した。粗体が溶解したことを確認した後に加熱を停止し、オイルバス中で室温まで冷却させることで結晶が析出した。結晶を回収し、(1 R, 3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (1, 1 - ジフルオロエチルピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物(B)、図中c o m p o u n d B) [9 0 5. 0 m g、2. 0 7 m m o l] の結晶を得た。

[0068] $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 6. 2 2 (1 H, d, J = 1 0. 7 H z), 5. 8 9 (1 H, d, J = 1 0. 7 H z), 5. 7 6 (1 H, t d, J = 5 7. 0, 5. 0 H z), 4. 0 6 - 3. 9 6 (2 H, m), 2. 8 4 (1 H, d d, J = 1 2. 0, 3. 8 H z), 2. 6 5 - 2. 5 2 (5 H, m), 2. 4 7 - 1. 4 9 (2 1 H, m), 1. 4 0 - 1. 2 2 (4 H, m), 1. 0 5 (3 H, d, J = 6. 3 H z), 0. 6 0 (3 H, s). E x a c t M a s s = 4 3 7. 3 1 ($\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{F}_2\text{NO}_2$) O b s. m a s s = 4 3 8. 3 5 (M+H)

[0069] <化合物(B)の結晶の評価>

得られた化合物(B)の結晶のXRDを図2に示す。回折角 2θ = 8. 9°、14. 2°、16. 2°、17. 9°、18. 5°、19. 1°、20. 1°、22. 6°、23. 0°、24. 3°、および30. 4°にピークが確認された。

[0070] 化合物(B)の結晶の示差走査熱量分析(DSC)における吸熱ピークの補外開始点温度は187℃であった。

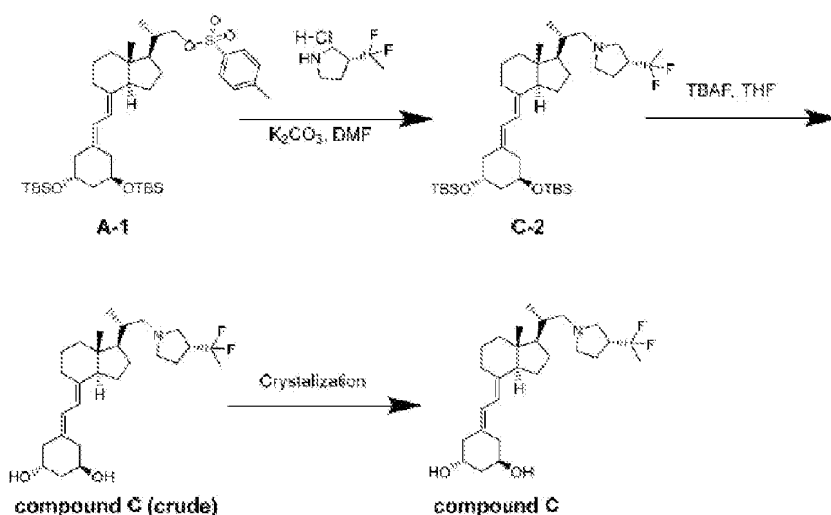
[0071] 得られた化合物(B)の結晶の ^{13}C 固体NMRスペクトルを図7に示す。

化学シフト 13. 1 ppm、19. 7 ppm、23. 2 ppm、29. 3 ppm、46. 3 ppm、65. 8 ppm、67. 7 ppm、117. 1 ppm、123. 2 ppm、132. 6 ppm、および 139. 2 ppm にピークが確認された。

[0072] [実施例 3]

(1R, 3R) - 5 - (2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (1, 1-ジフルオロエチル) ピロリジン - 1-イル) プロパン - 2-イル) - 7a-メチルオクタヒドロ - 4H-インデン - 4-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3-ジオール (化合物 (C)) の結晶の製造

[0073] [化7]



[0074] <工程 1 (ピロリジン環の導入)>

公知化合物である (S) - 2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 4 - (2 - ((3R, 5R) - 3, 5-ビス ((t-ブチルジメチルシリル) オキシ) シクロヘキシリデン) エチリデン) - 7a-メチルオクタヒドロ - 1H-インデン - 1-イル) プロピル 4-メチルベンゼンスルホネート (CAS No. 1621978-74-2、化合物 (A-1)、図中 A-1) [7. 33 g、10. 2 mmol] と公知化合物である (3R) - 3 - (1

， 1-ジフルオロエチル) ピロリジン 塩酸塩 (CAS No. 2708341-81-3) [1.88 g、11.0 mmol] と炭酸カリウム [5.65 g、40.9 mmol] の混合物のDMF [80 mL] とメタノール [40 mL] の混合溶液を60℃で17時間加熱攪拌した。混合物を飽和食塩水 [100 mL] に移し、酢酸エチル [200 mL] で抽出した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘプタン/酢酸エチル系] で粗精製し、(R)-1-((S)-2-((1R, 3aS, 7aR, E)-4-(2-((3R, 5R)-3, 5-ビス((t-ブチルジメチルシリル) オキシ) シクロヘキシリデン) エチリデン) -7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル) プロピル) -3-(1, 1-ジフルオロエチル) ピロリジン (化合物 (C-2)、図中C-2) [3.23 g、4.75 mmol] を得た。

Exact Mass = 679.50 (C₃₉H₇₁F₂NO₂Si₂) Obs. mass = 680.60 (M+H)

[0075] <工程2 (脱保護)>

化合物 (C-2) [3.23 g、4.75 mmol] のTHF溶液 [60 mL] にTBAF [1M THF溶液、15 mL、15 mmol] を室温で加えて、混合物を4時間還流した。混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に移し、ヘプタン/酢酸エチル (1/1) の混合溶液 [100 mL] で抽出した。有機相から1M塩酸 [100 mL] で逆抽出した。水相を5M水酸化ナトリウム水溶液 [20 mL] で中和し、さらに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 [20 mL] を加えると、白色懸濁液になった。この混合物を酢酸エチル [100 mL] で抽出し、有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮することで、粗体の(1R, 3R)-5-(2-((1R, 3aS, 7aR, E)-1-((S)-1-((R)-3-(1, 1-ジフルオロエチル) ピロリジン-1-イル) プロパン-2-イル) -7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物 (C) (crude)、図中compound C (

c r u d e)) [1. 0 8 8 g、2. 4 1 m m o l] を得た。

E x a c t M a s s = 4 5 1. 3 3 (C₂₇H₄₃F₂NO₂) O b s .

m a s s = 4 5 2. 4 0 (M+H)

[0076] <工程3 (結晶化)>

工程2で得た粗体(化合物(C) (c r u d e)) [1. 0 8 8 g、2. 4 1 m m o l] にアセトニトリル [2 0 m L] を加えて、オイルバス中5 0 °Cで攪拌した。粗体が溶解したことを確認した後に加熱を停止し、オイルバス中で室温まで冷却させることで結晶が析出した。結晶を回収し、(1 R, 3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (1, 1 - ジフルオロエチルピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール (化合物(C)、図中 c o m p o u n d C) [8 3 5 m g、1. 8 5 m m o l] の結晶を得た。

[0077] ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 6. 2 1 (1H, d, J = 1 1. 0 H z), 5. 8 9 (1H, d, J = 1 1. 0 H z), 4. 0 6 - 3. 9 5 (2H, m), 2. 8 3 (1H, dd, J = 1 1. 9, 3. 7 H z), 2. 7 2 - 1. 5 1 (2 7 H, m), 1. 4 5 - 1. 2 0 (3H, m), 1. 0 5 (3H, d, J = 6. 4 H z), 0. 6 0 (3H, s).

E x a c t M a s s = 4 5 1. 3 3 (C₂₇H₄₃F₂NO₂) O b s .

m a s s = 4 5 2. 4 0 (M+H)

[0078] <化合物(C)の結晶の評価>

得られた化合物(C)の結晶のXRDを図3に示す。回折角2θ = 1 4. 1°、1 5. 2°、1 5. 8°、1 6. 6°、1 7. 2°、1 8. 8°、2 0. 5°、2 1. 0°、2 1. 3°、および2 2. 6°にピークが確認された。

[0079] 化合物(C)の結晶の示差走査熱量分析(DSC)における吸熱ピークの補外開始点温度は1 5 9 °Cであった。

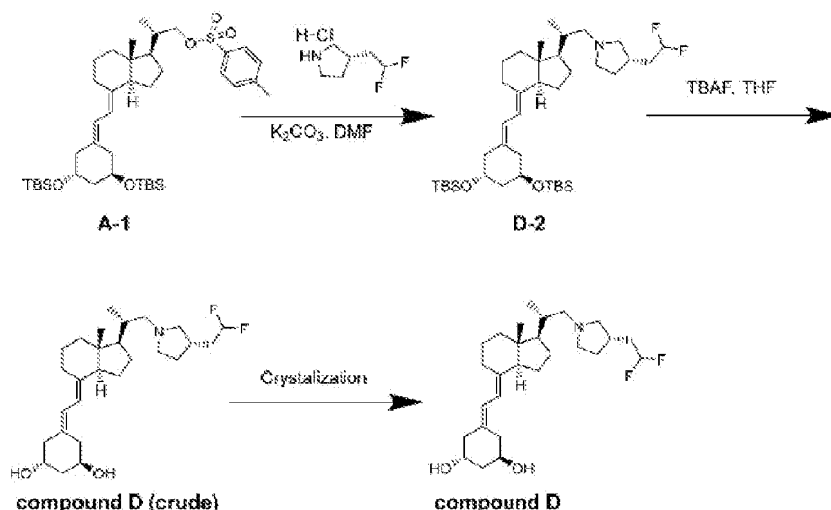
[0080] 得られた化合物 (C) の結晶の¹³C 固体NMRスペクトルを図7に示す。

化学シフト16.6 ppm、18.0 ppm、26.2 ppm、27.3 ppm、28.6 ppm、46.3 ppm、64.7 ppm、65.5 ppm、67.9 ppm、118.1 ppm、120.4 ppm、137.2 ppm、および138.8 ppmにピークが確認された。

[0081] [実施例4]

(1R, 3R) - 5 - (2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 1 - ((S) - 1 - ((S) - 3 - (2, 2-ジフルオロエチル) ピロリジン-1-イル) プロパン-2-イル) - 7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン) エチリデン) シクロヘキサノール (化合物 (D)) の結晶の製造

[0082] [化8]



[0083] <工程1 (ピロリジン環の導入)>

公知化合物である (S) - 2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 4 - (2 - ((3R, 5R) - 3, 5-ビス ((t-ブチルジメチルシリル) オキシ) シクロヘキシリデン) エチリデン) - 7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル) プロピル 4-メチルベンゼンスルホネート (CAS No. 1621978-74-2、化合物 (A-1)、図中A-1) [4.86 g、6.78 mmol] と公知化合物である (3S) - 3 - (2

、2-ジフルオロエチル)ピロリジン 塩酸塩 (CAS No. 2708342-85-0) [2.01 g、11.7 mmol] と炭酸カリウム [4.50 g、32.6 mmol] の混合物のDMF [30 mL] 溶液を60℃で20時間加熱攪拌した。混合物を飽和食塩水 [100 mL] に移し、酢酸エチル [100 mL] で抽出した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘプタン/酢酸エチル系] で粗精製し、(S)-1-((S)-2-((1R, 3aS, 7aR, E)-4-(2-((3R, 5R)-3, 5-ビス((t-ブチルジメチルシリル)オキシ)シクロヘキシリデン)エチリデン)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル)プロピル)-3-(2, 2-ジフルオロエチル)ピロリジン (化合物(D-2)、図中D-2) [3.08 g、4.53 mmol] を得た。

Exact Mass = 679.50 ($C_{39}H_{71}F_2NO_2Si_2$) Obs. mass = 680.60 (M+H)

[0084] <工程2 (脱保護)>

化合物(D-2) [3.08 g、4.53 mmol] のTHF溶液 [55 mL] にTBAF [1M THF溶液、14 mL、14 mmol] を室温で加えて、混合物を4.5時間還流した。混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に移し、ヘプタン/酢酸エチル (1/1) の混合溶液 [100 mL] で抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル [75 mL] で希釈し、有機相から1M塩酸 [100 mL] で逆抽出した。水相を5M水酸化ナトリウム水溶液 [20 mL] で中和し、さらに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 [30 mL] でpH=10に調整した。この混合物を酢酸エチル [100 mL] で抽出し、有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮することで、粗体の(1R, 3R)-5-(2-((1R, 3aS, 7aR, E)-1-((S)-1-((S)-3-(2, 2-ジフルオロエチル)ピロリジン-1-イル)プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イル)デ

ン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物 (D) (c r u d e)、図中c o m p o u n d D (c r u d e)) [1. 14 g、2. 52 mmol] を得た。

Exact Mass = 451. 33 (C₂₇H₄₃F₂NO₂) Obs.
mass = 452. 35 (M+H)

[0085] <工程3 (結晶化)>

工程2で得た粗体 (化合物 (D) (c r u d e)) [1. 14 g、2. 52 mmol] にアセトニトリル [19 mL] とメタノール [1 mL] の混合溶媒を加えて、オイルバス中50℃で攪拌した。粗体が溶解したことを確認した後に加熱を停止し、オイルバス中で室温まで冷却させることで結晶が析出した。結晶を回収し、(1R, 3R)-5-(2-((1R, 3aS, 7aR, E)-1-((S)-1-((S)-3-(2, 2-ジフルオロエチルピロリジン-1-イル) プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物 (D)、図中c o m p o u n d D) [786. 6 mg、1. 74 mmol] の結晶を得た。

[0086] ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 6. 21 (1H, d, J = 11. 0 Hz), 6. 03-5. 72 (2H, m), 4. 06-3. 95 (2H, m), 2. 83 (1H, dd, J = 12. 3, 3. 7 Hz), 2. 76 (1H, t, J = 8. 2 Hz), 2. 70 (1H, t, J = 7. 8 Hz), 2. 59 (1H, dd, J = 13. 3, 3. 7 Hz), 2. 43-2. 10 (8H, m), 2. 09-1. 46 (16H, m), 1. 43-1. 16 (3H, m), 1. 05 (3H, d, J = 6. 4 Hz), 0. 60 (3H, s).

Exact Mass = 451. 33 (C₂₇H₄₃F₂NO₂) Obs.
mass = 452. 35 (M+H)

[0087] <化合物 (D) の結晶の評価>

得られた化合物 (D) の結晶の X R D を図 4 に示す。回折角 $2\theta = 12.4^\circ$ 、 14.6° 、 16.2° 、 16.5° 、 18.3° 、 18.5° 、 19.2° 、 19.6° 、 19.8° 、および 22.7° にピークが確認された。

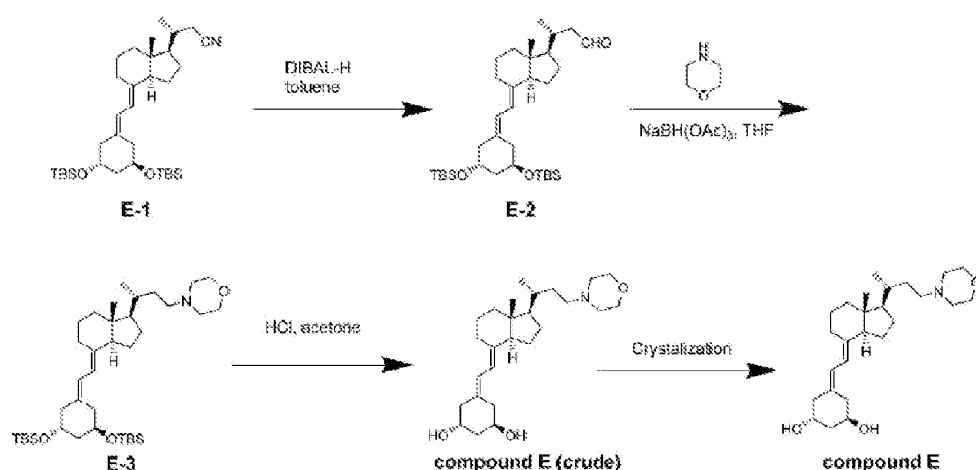
[0088] 化合物 (D) の結晶の示差走査熱量分析 (D S C) における吸熱ピークの補外開始点温度は 171°C であった。

[0089] 得られた化合物 (D) の結晶の ^{13}C 固体 NMR スペクトルを図 7 に示す。化学シフト 13.0 ppm 、 18.6 ppm 、 23.7 ppm 、 30.3 ppm 、 45.8 ppm 、 66.2 ppm 、 67.2 ppm 、 116.6 ppm 、 123.6 ppm 、 132.5 ppm 、および 141.1 ppm にピークが確認された。

[0090] [実施例 5]

(1 R, 3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 7 a - メチル - 1 - ((R) - 4 - モルホリノブタン - 2 - イル) オクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサノール (化合物 (E)) の結晶の製造

[0091] [化 9]



[0092] <工程 1 (D I B A L - H 還元)>

公知化合物である (R) - 3 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 4 - (

2-((3R, 5R)-3, 5-ビス((t-ブチルジメチルシリル)オキシ)シクロヘキシリデン)エチリデン)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル)ブタンニトリル[CAS No. 2489320-15-0、6.73g、11.8mmol、化合物(E-1)、図中E-1]のトルエン溶液[75mL]に-20℃で水素化ジイソブチルアルミニウム[DIBAL-H、1.5Mヘキサン溶液、12.5mL、18.75mmol]を内温が0℃を超えないように加えた。混合物を-15℃で30分攪拌した。混合物を飽和ロッシェル塩(酒石酸ナトリウムカリウム)水溶液[10mL]でクエンチし、室温まで昇温した。混合物に飽和ロッシェル塩(酒石酸ナトリウムカリウム)水溶液[30mL]をさらに加えて、混合物を室温で1時間攪拌した。水相を分液し、有機相を飽和ロッシェル塩(酒石酸ナトリウムカリウム)水溶液で2回洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮することで粗体の(R)-3-((1R, 3aS, 7aR, E)-4-(2-((3R, 5R)-3, 5-ビス((t-ブチルジメチルシリル)オキシ)シクロヘキシリデン)エチリデン)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-イル)ブタナール(化合物(E-2)、図中E-2)[7.87g]を得た。この粗体は更なる精製をすることなく次の反応に用いた。

[0093] <工程2(還元アミノ化)>

工程1で得た粗体の化合物(E-2)[7.87g]とモルホリン[13mL]のTHF溶液[65mL]にトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム[3.74g、17.6mmol]を室温下で加えて、同温で3時間攪拌した。混合物を水[5mL]でクエンチし、飽和食塩水[30mL]を加えた。混合物を酢酸エチル[50mL]で抽出し、有機相を飽和食塩水[50mL]で洗浄した。有機相は無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮することで、粗体の4-((R)-3-((1R, 3aS, 7aR, E)-4-(2-((3R, 5R)-3, 5-ビス((t-ブチルジメチルシリル)オキシ)シクロヘキシリデン)エチリデン)-7a-メチルオクタヒドロ-1H

ーインデンー1ーイル)ブチル)モルホリン(化合物(E-3)、図中E-3) [8.29 g]を得た。この粗体は更なる精製をすることなく次の反応に用いた。

[0094] <工程3 (脱保護)>

工程2で得た粗体の化合物(E-3) [8.29 g]をアセトン [100 mL]と水 [8 mL]の混合溶液で溶かし、ここに2 M塩酸 [23.6 mL、57.2 mmol]を室温に加えて、同温で3時間攪拌した。混合物に水 [90 mL]を加えて酢酸エチル [100 mL]で抽出した。水相を氷浴で冷却し、2 M水酸化ナトリウム水溶液 [12 mL]でpH=10に調整し、室温で1時間攪拌した。混合物をろ過して固体を回収し、乾燥することで、粗体の(1R, 3R)-5-(2-((1R, 3aS, 7aR, E)-7a-メチル-1-((R)-4-モルホリノブタン-2-イル)オクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1, 3-ジオール(化合物(E) (crude)、図中compound E (crude)) [3.54 g]を取得した。

[0095] <工程4 (中和晶析)>

工程3で得た粗体の化合物(E) [3.54 g]のアセトン溶液 [35 mL]に1 M塩酸 [10.2 mL]を加えた。その溶液に水 [52 mL]を加え、さらに1 M塩酸 [6.8 mL]を加えた。その溶液を酢酸エチルで抽出し、水相を2 M水酸化ナトリウム水溶液でpH=10に調整した。混合物を室温で1時間攪拌し、ろ過して固体を回収した。固体を乾燥することで、目的とする化合物(E) (図中compound E) [3.16 g、7.57 mmol]の結晶を得た。

[0096] $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 6.21 (1H, d, $J = 11.0$ Hz), 5.88 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 4.06–3.95 (2H, m), 3.69 (4H, t, $J = 4.6$ Hz), 2.83 (1H, dd, $J = 11.9, 4.1$ Hz), 2.59 (1H, dd, $J = 13.$

7, 3.7 Hz), 2.50–2.37 (6H, m), 2.33 (1H, td, J = 11.4, 5.3 Hz), 2.23–2.13 (2H, m), 2.06–1.93 (4H, m), 1.88–1.47 (9H, m), 1.39–1.27 (4H, m), 0.98 (3H, d, J = 6.4 Hz), 0.58 (3H, s).

Exact Mass = 417.32 ($C_{26}H_{43}NO_3$) Obs. mass = 418.35 (M+H)

[0097] <化合物 (E) の結晶の評価>

得られた化合物 (E) の結晶のXRDを図5に示す。回折角 $2\theta = 13.5^\circ$ 、 15.1° 、 16.4° 、 16.7° 、 17.2° 、 17.7° 、 18.1° 、 18.6° 、 20.3° 、および 21.6° にピークが確認された。

[0098] 化合物 (E) の結晶の示差走査熱量分析 (DSC) における吸熱ピークの補外開始点温度は 194°C であった。

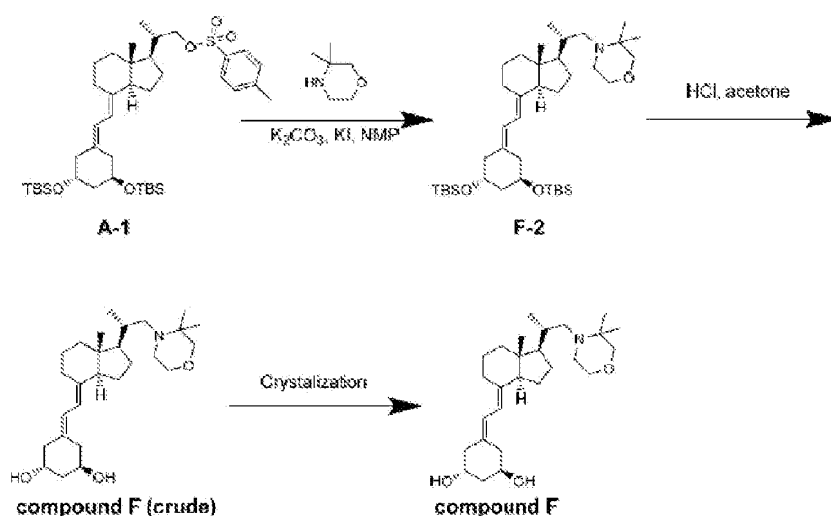
[0099] 得られた化合物 (E) の結晶の ^{13}C 固体NMRスペクトルを図7に示す。化学シフト 14.3 ppm 、 19.4 ppm 、 23.2 ppm 、 24.9 ppm 、 29.0 ppm 、 29.8 ppm 、 45.9 ppm 、 57.7 ppm 、 67.0 ppm 、 117.4 ppm 、 122.2 ppm 、 133.2 ppm 、および 139.6 ppm にピークが確認された。

[0100] [実施例6]

(1R, 3R)–5–(2–((1R, 3aS, 7aR, E)–1–((S)–1–(3, 3–ジメチルモルホリノ)プロパン–2–イル)–7a–メチルオクタヒドロ–4H–インデン–4–イリデン)エチリデン)シクロヘキサン–1, 3–ジオール (化合物 (F)) の結晶の製造

[0101]

[化10]



[0102] <工程 1（モルホリン環の導入）>

公知化合物である (S) - 2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 4 - (2 - ((3 R, 5 R) - 3, 5 - ビス ((t - ブチルジメチルシリル) オキシ) シクロヘキシリデン) エチリデン) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イル) プロピル 4 - メチルベンゼンスルホネート (CAS No. 1621978-74-2、化合物 (A-1)、図中 A-1) [20.3 g、28.3 mmol] の N - メチルーピロリドン溶液 [160 mL] に 3, 3 - ジメチルモルホリン (CAS No. 59229-63-9) [7.0 mL、11.7 mmol]、ヨウ化カリウム [5.56 g、33.5 mmol] と炭酸カリウム [10.89 g、78.79 mmol] を加えて、70℃で16時間加熱攪拌した。混合物をヘプタン [120 mL] と水 [120 mL] を加えて、水相を除去した。水相は酢酸エチル [100 mL] で抽出した。併せた有機相を10%チオ硫酸ナトリウム水溶液 [100 mL] で2回洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮して、粗体の 4 - ((S) - 2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 4 - (2 - ((3 R, 5 R) - 3, 5 - ビス ((t - ブチルジメチルシリル) オキシ) シクロヘキシリデン) エチリデン) - 7 a - メチルオクタヒドロ -

1 H-インデン-1-イル) プロピル) -3, 3-ジメチルモルホリン (化合物 (F-2)、図中 F-2) [19.22 g] を得た。この粗体は、これ以上の精製をせずに次反応に用いた。

Exact Mass = 659.51 ($C_{39}H_{73}NO_3Si_2$) Obs.
mass = 660.35 (M+H)

[0103] <工程2 (脱保護)>

工程1で得た粗体の化合物 (F-2) [19.22 g] の2-ブタノン溶液 [100 mL] に2M塩酸 [100 mL、200 mmol] を室温に加えて、混合物を75分間攪拌した。混合物をヘプタン [100 mL] で抽出した。さらに水相をヘプタン [50 mL] と2-ブタノン [50 mL] の混合溶媒で洗浄した。水相を0℃で攪拌しながら5M水酸化ナトリウム水溶液 [100 mL] で中和した。さらに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 [50 mL] を加えてpH=10に調整すると白色懸濁液になった。この混合物を室温で1時間攪拌し、混合物をろ過して固体を回収し、乾燥することで、粗体の (1R, 3R)-5-(2-((1R, 3aS, 7aR, E)-1-((S)-1-(3, 3-ジメチルモルホリノ) プロパン-2-イル)-7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオール (化合物 (F) (crude)、図中 compound F (crude)) [11.71 g、27.13 mmol] を得た。

Exact Mass = 431.34 ($C_{27}H_{45}NO_3$) Obs. mass = 432.20 (M+H)

[0104] <工程3 (結晶の精製としてのスラリー洗浄)>

工程1、2の製法で製造した粗体の化合物 (F) (crude) [23.20 g、53.75 mmol] にエタノール [460 mL] を加えて、オイルバス中60℃で16時間攪拌した。室温まで冷却後に結晶を回収し、1R、3R)-5-(2-((1R, 3aS, 7aR, E)-1-((S)-1-(3, 3-ジメチルモルホリノ) プロパン-2-イル)-7a-メチルオ

クタヒドロ-4H-インデン-4-イリデン)エチリデン)シクロヘキサン-1,3-ジオール(化合物(F)、図中compound F)[18.61g、43.12mmol]の結晶を得た。

[0105] $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 6.21 (1H, d, $J = 11.0$ Hz), 5.89 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 4.06–3.94 (2H, m), 3.82–3.78 (1H, m), 3.65–3.59 (1H, m), 3.39 (1H, d, $J = 11.0$ Hz), 3.32 (1H, s), 2.85–2.81 (1H, m), 2.73–2.69 (1H, m), 2.62–2.56 (2H, m), 2.40 (1H, dd, $J = 13.5, 3.4$ Hz), 2.33–2.13 (4H, m), 2.07–1.97 (3H, m), 1.87–1.81 (1H, m), 1.78–1.72 (1H, m), 1.67–1.50 (6H, m), 1.37–1.25 (3H, m), 1.06–1.04 (6H, m), 1.01 (3H, s), 0.60 (3H, s).
Exact Mass = 431.34 ($\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{NO}_3$) Obs. mass = 432.20 (M+H)

[0106] <化合物(F)の結晶の評価>

得られた化合物(F)の結晶のXRDを図6に示す。回折角 $2\theta = 13.7^\circ$ 、 15.3° 、 16.1° 、 16.4° 、 17.3° 、 19.1° 、 19.6° 、 21.2° 、 22.8° 、および 24.1° にピークが確認された。

[0107] 化合物(F)の結晶の示差走査熱量分析(DSC)における吸熱ピークの補外開始点温度は 218°C であった。

[0108] 得られた化合物(F)の結晶の ^{13}C 固体NMRスペクトルを図7に示す。化学シフト13.4ppm、14.2ppm、18.3ppm、23.7ppm、25.2ppm、28.3ppm、29.5ppm、46.4ppm

、117.4 ppm、123.0 ppm、132.6 ppm、および140.0 ppmにピークが確認された。

[0109] 〔実施例7〕

ラットオリゴデンドロサイト前駆細胞分化誘導促進作用評価

本発明のビタミンD誘導体について、オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）分化誘導促進作用をミエリンベースックプロテイン（ミエリン塩基性蛋白、MBP）免疫染色で評価した。

[0110] （1）ラットオリゴデンドロサイト前駆細胞の採取

SDラット（日本チャールスリバー・1日齢）から採取した前脳を70 μ mセルストレーナー（Falcon #352350）で破碎し、オリゴデンドロサイト前駆細胞分離培地（20% FBS/2mM Glutamax（Gibco #35050-061）/1mM ピルビン酸ナトリウム（Gibco #11360-070）/1% ペニシリンーストレプトマイシン（Invitrogen #15140-122）/DMEM（Gibco #11960-044））にて回収することで細胞浮遊液を調製した。ポリ-D-リジンコートT75フラスコ（Thermo Fisher Scientific #132704）に細胞浮遊液を播種し、10日間培養（37℃、5%CO₂）を実施した。培養後、フラスコをロータリーシェーカー（和研薬 #WB-101SRC）を用いて約1時間振とうし（37℃、100rpm）、上清を廃棄することでミクログリアを除外した。その後、フラスコにオリゴデンドロサイト前駆細胞分離培地を添加し、同様に約22時間振とう（37℃、200rpm）後、上清を回収することでオリゴデンドロサイト前駆細胞を調製した。

[0111] （2）オリゴデンドロサイト前駆細胞分化誘導促進作用評価

調製したオリゴデンドロサイト前駆細胞を分化培地（2% B27（Thermo Fisher Scientific社 #17504-044）/1% ペニシリンーストレプトマイシン（Invitrogen社 #15140-122）/1% ピルビン酸ナトリウム（富士フイルム和光純

薬社 #191-03061) / 10 ng/mL CNTF (Pepr o T e c h 社 #AF-450-13) / DMEM (G i b c o 社 #11960-044)) にて懸濁し、ポリ-L-オルニチン (富士フィルム和光純薬社 #163-27421) でコートした 96 w e l l p l a t e に 0.65×10^4 c e l l s / w e l l の条件で播種した。細胞播種後、被験化合物の DMSO 溶液 (20 mM) から分化培地にて調製した溶液 (トリョードサイロニン (T_3 ・陽性対照)) = 30 nM、または本発明のビタミン D 誘導体 = 2 μ M)、または DMSO を分化培地にて調製した溶液をウェル中の DMSO 濃度が 0.1 % の状態になるように添加し、4 日間培養した (37 °C、5 % CO_2)。被験化合物は、N = 3 または N = 6 で評価した。培養後、細胞を固定 (4 % パラホルムアルデヒド溶液、30 分間、室温)、PBS 洗浄、膜透過処理 (0.1 % T r i o n X-100 (S I G M A 社 #X100-100ML) / PBS、3 分、室温)、ブロッキング (3 % BSA (S I G M A 社 #A9647-10G) / PBS、1 時間、室温)、一次抗体反応 (MBP 抗体 (a b c a m 社 #a b 4 0 3 9 0)、2.5 μ g/mL、4 °C、24 時間)、PBS 洗浄、二次抗体反応 (A l e x a 4 8 8 a n t i - r a b b i t I g G (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社 # (A) -11034)、5 μ g/mL、室温、1 時間)、PBS 洗浄、核染色 (H o e c h s t 3 3 3 4 2 (D O J I N D O #N U 0 4 3)、10 μ g/mL、室温、5 分) の方法で、MBP について免疫染色を実施した。その後、蛍光顕微鏡 (K E Y E N C E 社 #BZ-X800) を用いて各 w e l l の画像を取得し、画像解析アプリケーション (K E Y E N C E 社 #BZ-X800 A n a l y z e r) を用いて、MBP 陽性細胞数および H o e c h s t 3 3 3 4 2 陽性細胞数を計測し、その割合 (M B P 陽性細胞数 / H o e c h s t 3 3 3 4 2 陽性細胞数) を算出した。

[0112] (3) 結果

結果を下表に示す。なお下表における有意差は、DMSO 群に対して t 検定を行った時の有意差を以下のように示す。

* : < 0. 0 5
 ** : < 0. 0 1
 *** : < 0. 0 0 1
 **** : < 0. 0 0 0 1
 n s : 有意差なし

[0113] [表1-1]

試験1

化合物名	平均値(mean)	標準偏差(S. D.)	有意差
DMSO	0. 09	0. 02	
T3	0. 49	0. 03	****
化合物(A)	0. 47	0. 05	****
化合物(B)	0. 38	0. 03	****
化合物(C)	0. 57	0. 03	****

[表1-2]

試験2

化合物名	平均値(mean)	標準偏差(S. D.)	有意差
DMSO	0. 07	0. 03	
T3	0. 46	0. 09	****
化合物(D)	0. 53	0. 03	****
化合物(E)	0. 36	0. 07	****

[表1-3]

試験3

化合物名	平均値(mean)	標準偏差(S. D.)	有意差
DMSO	0. 16	0. 02	
T3	0. 44	0. 03	****
化合物(F)	0. 50	0. 04	****

[0114] 表1-1、1-2、1-3で示した通り、本発明のビタミンD誘導体は、免疫染色による評価で強いオリゴデンドロサイト前駆細胞分化誘導促進作用を示した。

[0115] [実施例8]

マウス脳移行性評価

[0116] 試験1 (1mg/kg投与の試験)

被験化合物（10 mg/mL エタノール溶液）を0.1% Trion X-100（SIGMA #X100-100ML）／生理食塩水で100倍希釈し、投与液を調製した。この投与液をC57BL/6Jマウス（8週齢、雄、N=3）に単回経口投与（1 mg/kg）した。投与後、0.25、0.5、1、2、4、および8時間後の6点においてマウスを安楽死処置し、血漿および脳のサンプリングを実施した。採取した脳はTissue Lyser II（QIAGEN #85300）を用いてホモジネートを作製した後、アセトニトリルを添加し遠心分離（トミー精工MX-307、12000 rpm、5分間）することで、脳内に含まれる被験化合物の抽出を実施した。同様に、血漿についてもアセトニトリルを添加し遠心分離することで、血漿内に含まれる被験化合物の抽出を実施した。抽出した各サンプルは、LC/MS/MS（SHIMADZU UFLC/MS/MS（8050））を用いて、被験化合物の濃度測定を実施した。

[0117] 評価した各被験化合物の脳中濃度の最大値（脳Cmax）を示す時（脳Cmax時）における血漿中濃度と脳中濃度の結果を以下の表に平均値±SD（標準偏差）で示す。また脳中濃度／血漿中濃度比（各脳中濃度（平均値）を血漿中濃度（平均値）で除した数値）を以下の表に示す。

[0118] [表2]

化合物	脳Cmax時における		脳中濃度／ 血漿中濃度比
	血漿中濃度 (nM)	脳中濃度 (pmol/g)	
化合物(A)	316±84	529±53	1.67
化合物(B)	218±31	384±40	1.76
化合物(C)	251±9	562±50	2.24
化合物(D)	74±1	80±9	1.08
化合物(E)	580±107	595±23	1.03

[0119] 試験2（0.2 mg/kg投与の試験）

被験化合物（2 mg/mL エタノール溶液）を0.1% Trion X-100（SIGMA #X100-100ML）／生理食塩水で100倍

希釈し、投与液を調製した。この投与液をC57BL/6Jマウス（8週齢、雄、N=3）に単回経口投与（0.2mg/kg）した。投与後、0.25、0.5、1、2、4、および8時間後の6点においてマウスを安楽死処置し、血漿および脳のサンプリングを実施した。採取した脳はTissue Lysar II（QIAGEN #85300）を用いてホモジネートを作製した後、アセトニトリルを添加し遠心分離（トミー精工MX-307、12000rpm、5分間）することで、脳内に含まれる被験化合物の抽出を実施した。同様に、血漿についてもアセトニトリルを添加し遠心分離することで、血漿内に含まれる被験化合物の抽出を実施した。抽出した各サンプルは、LC/MS/MS（SHIMADZU UFLC/MS/MS（8050））を用いて、被験化合物の濃度測定を実施した。

[0120] 評価した各被験化合物の脳中濃度の最大値（脳Cmax）を示す時（脳Cmax時）における血漿中濃度と脳中濃度の結果を以下の表に平均値±SD（標準偏差）で示す。また脳中濃度／血漿中濃度比（各脳中濃度（平均値）を血漿中濃度（平均値）で除した数値）を以下の表に示す。

[0121] [表3]

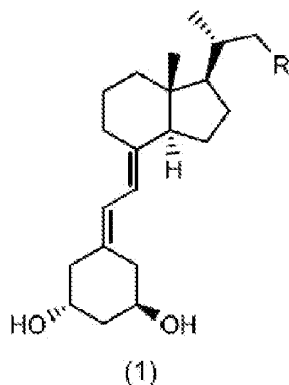
化合物	脳Cmax時における		脳中濃度／ 血漿中濃度比
	血漿中濃度 (nM)	脳中濃度 (pmol/g)	
化合物(F)	58.9±0.5	137.8±11.5	2.38

[0122] 本発明の化合物はいずれも、経口投与の条件であっても脳中濃度／血漿中濃度比が1.03～2.38を示した。非特許文献5によれば、1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の脳中濃度／血中濃度比は0.007±0.003であることが報告されている。従って本発明の化合物は1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃に比べて、中枢移行性が大幅に改善された化合物であることがいえる。

請求の範囲

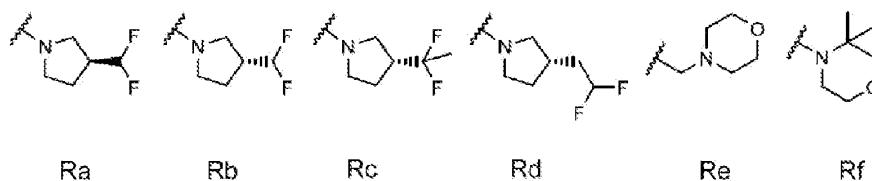
[請求項1] 下記式（１）：

[化1]



〔式中、Rは、下記式におけるR a、R b、R c、R d、R e、またはR fのいずれかの構造を表す。〕

[化2]



〕で表されるビタミンD誘導体の結晶、または式（１）で表されるビタミンD誘導体の溶媒和物の結晶。

[請求項2] (1 R、3 R)－5－(2－((1 R、3 a S、7 a R、E)－1－((S)－1－((S)－3－(ジフルオロメチル)ピロリジン－1－イル)プロパン－2－イル)－7 a－メチルオクタヒドロ－4 H－インデン－イリデン)エチリデン)シクロヘキサン－1，3－ジオールの結晶である、請求項1に記載の結晶。

[請求項3] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角（ $2\theta \pm 0.2^\circ$ ）＝14.2°、16.3°、17.9° および18.5° のピークを有することを特徴とする、請求項2に記載の結晶。

[請求項4] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角（ $2\theta \pm 0.2^\circ$ ）＝8

、 9° 、 14.2° 、 16.3° 、 17.9° および 18.5° のピークを有することを特徴とする、請求項2に記載の結晶。

[請求項5] 粉末X線回折スペクトルが、図1に示すパターンを有する、請求項2に記載の結晶。

[請求項6] 固体NMRスペクトル (^{13}C) において、化学シフト (± 0.5 ppm) = 13.6 ppm、 19.2 ppm、 117.2 ppm、 121.8 ppm、 133.6 ppm、および 138.5 ppm のピークを有することを特徴とする、請求項2に記載の結晶。

[請求項7] 固体NMRスペクトル (^{13}C) が、図7に示すパターンを有する、請求項2に記載の結晶。

[請求項8] 示差熱分析における吸熱ピークの補外開始点温度が $171 \pm 5^{\circ}\text{C}$ である、請求項2に記載の結晶。

[請求項9] (1R, 3R) - 5 - (2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (ジフルオロメチル) ピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7a - メチルオクタヒドロ - 4H - インデン - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオール の結晶である、請求項1に記載の結晶。

[請求項10] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^{\circ}$) = 14.2° 、 16.2° 、 17.9° 、 18.5° および 24.3° のピークを有することを特徴とする、請求項9に記載の結晶。

[請求項11] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^{\circ}$) = 8.9° 、 14.2° 、 16.2° 、 17.9° 、 18.5° 、 24.3° および 30.4° のピークを有することを特徴とする、請求項9に記載の結晶。

[請求項12] 粉末X線回折スペクトルが、図2に示すパターンを有する、請求項9に記載の結晶。

[請求項13] 固体NMRスペクトル (^{13}C) において、化学シフト (± 0.5 ppm) = 13.1 ppm、 19.7 ppm、 117.1 ppm、 1

23.2 ppm、132.6 ppm、および139.2 ppmのピークを有することを特徴とする、請求項9に記載の結晶。

[請求項14] 固体NMRスペクトル (^{13}C) が、図8に示すパターンを有する、請求項9に記載の結晶。

[請求項15] 示差熱分析における吸熱ピークの補外開始点温度が $187 \pm 5^\circ\text{C}$ である、請求項9に記載の結晶。

[請求項16] (1R, 3R) - 5 - (2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 1 - ((S) - 1 - ((R) - 3 - (1, 1-ジフルオロエチル) ピロリジン-1-イル) プロパン-2-イル) - 7a-メチルオクタヒドロ-4H-インデン-イリデン) エチリデン) シクロヘキサン-1, 3-ジオールの結晶である、請求項1に記載の結晶。

[請求項17] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) = 14.1°、15.2°、15.8°、16.6° および18.8° のピークを有することを特徴とする、請求項16に記載の結晶。

[請求項18] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) = 14.1°、15.2°、15.8°、16.6°、17.2°、18.8°、21.3° および22.6° のピークを有することを特徴とする、請求項16に記載の結晶。

[請求項19] 粉末X線回折スペクトルが、図3に示すパターンを有する、請求項16に記載の結晶。

[請求項20] 固体NMRスペクトル (^{13}C) において、化学シフト (± 0.5 ppm) = 16.6 ppm、18.0 ppm、118.1 ppm、120.4 ppm、137.2 ppm、および138.8 ppmのピークを有することを特徴とする、請求項16に記載の結晶。

[請求項21] 固体NMRスペクトル (^{13}C) が、図9に示すパターンを有する、請求項16に記載の結晶。

[請求項22] 示差熱分析における吸熱ピークの補外開始点温度が $159 \pm 5^\circ\text{C}$ である、請求項16に記載の結晶。

- [請求項23] (1 R, 3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 1 - ((S) - 1 - ((S) - 3 - (2, 2 - ジフルオロエチル) ピロリジン - 1 - イル) プロパン - 2 - イル) - 7 a - メチルオクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサ - 1, 3 - ジオールの結晶である、請求項 1 に記載の結晶。
- [請求項24] 粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) = 4.6° 、 16.2° 、 16.5° および 18.3° のピークを有することを特徴とする、請求項 23 に記載の結晶。
- [請求項25] 粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) = 2.4° 、 14.6° 、 16.2° 、 16.5° および 18.3° のピークを有することを特徴とする、請求項 23 に記載の結晶。
- [請求項26] 粉末 X 線回折スペクトルが、図 4 に示すパターンを有する、請求項 23 に記載の結晶。
- [請求項27] 固体 NMR スペクトル (^{13}C) において、化学シフト ($\pm 0.5 \text{ ppm}$) = 13.0 ppm 、 18.6 ppm 、 116.6 ppm 、 123.6 ppm 、 132.5 ppm 、および 141.1 ppm のピークを有することを特徴とする、請求項 23 に記載の結晶。
- [請求項28] 固体 NMR スペクトル (^{13}C) が、図 10 に示すパターンを有する、請求項 23 に記載の結晶。
- [請求項29] 示差熱分析における吸熱ピークの補外開始点温度が $171 \pm 5^\circ\text{C}$ である、請求項 23 に記載の結晶。
- [請求項30] (1 R, 3 R) - 5 - (2 - ((1 R, 3 a S, 7 a R, E) - 7 a - メチル - 1 - ((R) - 4 - モルホリノブタン - 2 - イル) オクタヒドロ - 4 H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサ - 1, 3 - ジオールの結晶である、請求項 1 に記載の結晶。
- [請求項31] 粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) = 3.5° 、 16.4° 、 18.1° および 20.3° のピークを有することを特徴とする、請求項 30 に記載の結晶。

- [請求項32] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) = 13.5° 、 16.4° 、 16.7° 、 18.1° および 20.3° のピークを有することを特徴とする、請求項30に記載の結晶。
- [請求項33] 粉末X線回折スペクトルが、図5に示すパターンを有する、請求項30に記載の結晶。
- [請求項34] 固体NMRスペクトル (^{13}C) において、化学シフト ($\pm 0.5 \text{ ppm}$) = 14.3 ppm 、 19.4 ppm 、 117.4 ppm 、 122.2 ppm 、 133.2 ppm 、および 139.6 ppm のピークを有することを特徴とする、請求項30に記載の結晶。
- [請求項35] 固体NMRスペクトル (^{13}C) が、図11に示すパターンを有する、請求項30に記載の結晶。
- [請求項36] 示差熱分析における吸熱ピークの補外開始点温度が $194 \pm 5^\circ\text{C}$ である、請求項30に記載の結晶。
- [請求項37] (1R, 3R) - 5 - (2 - ((1R, 3aS, 7aR, E) - 1 - ((S) - 1 - (3, 3 - ジメチルモルホリノ) プロパン - 2 - イル) - 7a - メチルオクタヒドロ - 4H - インデン - 4 - イリデン) エチリデン) シクロヘキサン - 1, 3 - ジオールの結晶である、請求項1に記載の結晶。
- [請求項38] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) = 16.1° 、 16.4° および 17.3° のピークを有することを特徴とする、請求項37に記載の結晶。
- [請求項39] 粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) = 13.7° 、 15.3° 、 16.1° 、 16.4° 、 17.3° 、 19.1° および 19.6° のピークを有することを特徴とする、請求項37に記載の結晶。
- [請求項40] 粉末X線回折スペクトルが、図6に示すパターンを有する、請求項37に記載の結晶。
- [請求項41] 固体NMRスペクトル (^{13}C) において、化学シフト (± 0.5

p p m) = 13.4 p p m、14.2 p p m、18.3 p p m、117.4 p p m、123.0 p p m、132.6 p p m、および140.0 p p mのピークを有することを特徴とする、請求項37に記載の結晶。

- [請求項42] 固体NMRスペクトル (^{13}C) が、図12に示すパターンを有する、請求項37に記載の結晶。
- [請求項43] 示差熱分析における吸熱ピークの補外開始点温度が $218 \pm 5^\circ\text{C}$ である、請求項37に記載の結晶。
- [請求項44] 請求項1～43のいずれか1項に記載の結晶、および製薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
- [請求項45] 請求項1～43のいずれか1項に記載の結晶を有効成分として含有する、オリゴデンドロサイト前駆細胞からオリゴデンドロサイトへの分化誘導を促進させるための医薬組成物。
- [請求項46] 請求項1～43のいずれか1項に記載の結晶を有効成分として含有する、再髄鞘化促進薬。
- [請求項47] 請求項1～43のいずれか1項に記載の結晶を有効成分として含有する、多発性硬化症、視神経脊髄炎、進行性多巣性白質脳症、多系統萎縮症、急性散在性脳脊髄炎、アトピー性脊髄炎、HTLV-1関連脊髄症、HIV関連白質脳症、クラッペ病、ギランバレー症候群、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、シャルコー・マリー・トゥース病、パーキンソン病、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害、自閉症スペクトラム障害、注意欠如多動性障害、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、薬物依存症による抑うつ、自閉症、アルツハイマー型認知症、および虚血性脳卒中からなる群から選ばれる一つ以上の疾患の治療剤。