

約2.0~5.0モルの範囲から適宜選択すれば良く、好ましくは、約3.0~4.5モルであり、より好ましくは、約3.9~4.3モルである。

[0020] 本反応における反応温度は、反応規模等に応じて適宜選択することができ、通常は、反応液の内温約120~150°Cの範囲であれば良く、好ましくは、約130~140°Cである。

本反応における反応時間は、反応規模や反応温度等により一定しないが、通常は、数分~約7時間の範囲で適宜選択すれば良く、好ましくは、約4~7時間であり、より好ましくは、約5~6時間である。数分とは、約1分~10分程度を意味する。

[0021] <ステップ2の製造方法>

式(3)で表される N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-クロロアセトアミド)は、式(2)で表される4,4'-(シクロヘキシルメチレン)ジアニリンを、好ましくは、塩基及び溶媒の存在下、クロロアセチルクロリドと反応させることにより製造することができる。

式(3)で表される N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-クロロアセトアミド)の代わりに N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-ブromoアセトアミド)を製造しても良く、この場合は、クロロアセチルクロリドの代わりに、ブromoアセチルブromiドを使用しても良い。

[0022] 本反応で使用する塩基としては、例えば、トリエチルアミン、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、ピリジン、 N,N -ジメチル-4-アミノピリジン、1,4-ジアザビシクロ[2,2,2]オクタン、 N,N -ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられ、好ましくは、トリエチルアミンである。塩基の使用量は、反応規模や反応温度等により一定しないが、通常は、式(2)で表される4,4'-(シクロヘキシルメチレン)ジアニリン1モル対して、約2.0~3.0モルの範囲から適宜選択すれば良く、好ましくは、約2.15~2.17モルである。

[0023] 本反応で使用する溶媒としては、好ましくは、ジクロロメタン、クロロホルム、CPME等である。溶媒の使用量は、特に限定されないが、通常は、

式(2)で表される4,4'-(シクロヘキシルメチレン)ジアニリン1重量部に対して、約1.0~45倍容量の範囲から適宜選択すれば良く、好ましくは、約40~50倍容量であり、より好ましくは、約44~46倍容量である。

[0024] 本反応で使用するクロロアセチルクロリドの使用量は、反応規模や反応温度等により一定しないが、通常は、式(2)で表される4,4'-(シクロヘキシルメチレン)ジアニリン1モルに対して、約2.0~3.0モルの範囲から適宜選択すれば良く、好ましくは、約2.17~2.20モルである。

[0025] 本反応における反応温度は、反応規模等に応じて適宜選択することができ、通常は、反応液の内温約-4~0°Cの範囲であれば良く、好ましくは、約-4~-1°Cである。

本反応における反応時間は、反応規模や反応温度等により一定しないが、通常は、数分~約20時間の範囲で適宜選択すれば良く、好ましくは、約15~20時間であり、より好ましくは、約16~18時間である。

[0026] <ステップ3の製造方法>

式(1)で表されるN,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]は、式(3)で表されるN,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-クロロアセトアミド)を、好ましくは、溶媒の存在下、ピロリジンと反応させることにより製造することができる。また、式(3)で表されるN,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-クロロアセトアミド)の代わりに、N,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-ブromoアセトアミド)を使用しても良い。

[0027] 本反応で使用されるピロリジンの使用量は、反応規模や反応温度等により一定しないが、通常は、式(3)で表されるN,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-クロロアセトアミド)1モルに対して、約2.0~5.0モルの範囲から適宜選択すれば良く、好ましくは、約4.0~5.0モルであり、より好ましくは、約4.4~4.6モルである。

本反応で使用される溶媒としては、好ましくは、THF、酢酸エチル、ジ

イソプロピルエーテル、ベンゼン、ジエチルエーテル、トルエン等である。溶媒の使用量は、特に限定されないが、通常は、式(3)で表される N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-クロロアセトアミド) 1重量部に対して、約1.0~55.0倍容量の範囲から適宜選択すれば良く、好ましくは、約50~55倍容量であり、より好ましくは、約51.7~53.0倍容量である。

[0028] 本反応における反応温度は、反応規模等に応じて適宜選択することができ、通常は、反応液の内温約22~28℃の範囲であれば良く、好ましくは、約25~26℃である。

本反応における反応時間は、反応規模や反応温度等により一定しないが、通常は、数分~約20時間の範囲で適宜選択すれば良く、好ましくは、約15~20時間であり、より好ましくは、約17~19時間である。

[0029] <ステップ4の製造方法>

式(4)で表される N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩は、式(1)で表される N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]を、溶媒の存在下、マレイン酸と反応させることにより製造することができる。

[0030] 本反応で使用される溶媒としては、好ましくは、THF、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼン、トルエン等である。溶媒の使用量は、特に限定されないが、通常は、式(1)で表される N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド] 1重量部に対して、約1.0~130倍容量の範囲から適宜選択すれば良く、好ましくは、約120~130倍容量であり、より好ましくは、約125~129倍容量である。

[0031] 本反応で使用されるマレイン酸の使用量は、反応規模や反応温度等により一定しないが、通常は、式(1)で表される N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド] 1モルに対して、約2.0~3.0モルの範囲から適宜選択すれば良く、好ましくは、

約2.2~2.5モルである。

[0032] 本反応における反応温度は、反応規模等に応じて適宜選択することができ、通常は、反応液の内温約0~30°Cの範囲であれば良く、好ましくは、約20~30°Cであり、より好ましくは約25~26°Cである。

本反応における反応時間は、反応規模や反応温度等により一定しないが、通常は、数分~約5時間の範囲で適宜選択すれば良く、好ましくは、約3~5時間であり、より好ましくは、約4.0~4.5時間である。

各反応終了後、抽出、転溶、濃縮、クロマトグラフィー、結晶化、再結晶等の自体公知の手段を適宜に採用して本発明の塩を容易に取得できる。

[0033] 本発明のマレイン酸塩は、良好な抗プリオン活性を有する。本発明における抗プリオン活性とは、異常型プリオンタンパク質の生成を抑制する活性を意味する。

本発明のマレイン酸塩は、正常型プリオンタンパク質に強固に結合し、正常型プリオンタンパク質の異常型プリオンタンパク質への構造変換を阻止することができるため、良好な抗プリオン活性を有する。

本発明のマレイン酸塩は、正常型プリオンタンパク質の構造変換抑制や、プリオン病の予防、改善又は治療のために使用できる。本発明のマレイン酸塩を、プリオン病の患者に有効量を投与することにより、プリオン病を予防、改善又は治療することができる。

本発明のマレイン酸塩は、また、ステーキ、食肉等の食品や飲料等に添加して利用することもできる。従って、本発明は、本発明の化合物を含有する食品、食品添加物等も提供する。

[0034] 本発明における「正常型プリオンタンパク質」とは、正常な細胞に発現している感染性を有しないプリオンタンパク質を意味し、「異常型プリオンタンパク質」とは、正常型プリオンタンパク質とアミノ酸配列は同一であるが、立体構造が異なり、感染性を有するプリオンタンパク質を意味する。また、「プリオンに感染する」とは、異常型プリオンタンパク質に構造変換している状態を意味する。

[0035] 本発明におけるプリオン病とは、正常型プリオンタンパク質が構造変換して生成される異常型プリオンタンパク質により引き起こされる疾患であり、プリオン病としては、例えば、羊のスクレイピー、ウシ海綿状脳症、クロイツフェルト・ヤコブ病、GSS、FFI、クールーおよび変異型ヤコブ病等が挙げられる。

[0036] 本発明において、「予防」は、発症の回避、遅延、又は発症率の低下を包含し、「改善」及び「治療」は、症状の軽快、症状の進行抑制、及び治癒ないしは完快を包含する。

[0037] <医薬組成物>

本発明は、本発明のマレイン酸塩を有効成分として含有する医薬組成物も含む。

本発明の医薬組成物は、好ましくは、プリオン病の予防、改善又は治療剤である。本発明の医薬組成物は、ヒトや他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。

本発明の医薬組成物の製造方法は、本発明のマレイン酸塩を原料に含んで製造されるものであれば、特に限定されず、従来公知の方法に従って製造することができる。

尚、本発明の医薬組成物は、脳に到達する製剤であることが好ましい。

[0038] 本発明の医薬組成物の剤型は、特に限定されないが、例えば、注射剤、クリーム、軟膏、飲料剤、エアロゾル、皮膚ゲル、点眼剤、点鼻剤等の液状製剤；錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、除放剤、坐薬等の固形製剤等が挙げられる。剤型は、プリオン病疾患患者が使用し易い剤型である点で、好ましくは、注射剤、錠剤等である。注射剤は、水性注射剤又は油性注射剤のいずれでも良い。

尚、注射剤等の液状製剤は、凍結保存又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用される。

[0039] 本発明の医薬組成物は、何れの剤型の場合も、本発明のマレイン酸塩に加えて、薬学的に許容される基剤又は担体、薬学的に許容される添加剤、本発明のマレイン酸塩以外の生理活性成分若しくは薬理活性成分等を含むことができる。

本発明の医薬組成物は、何れの剤型の場合も、食品、食品添加物、サプリメント、健康食品として使用されて良く、通常、常法により、容器又は袋に收容することができる。容器又は袋は、食品、サプリメント、医薬品、健康食品等の容器として使用可能なものであれば特に限定されず、本発明の医薬組成物の剤型に応じて、従来公知のものを適宜選択して使用することができる。

[0040] 本発明の医薬組成物の性状は特に限定されず、例えば、液体状、流動状、ゲル状、半固形状、固体状等が挙げられる。また、用時調製により、液体状、流動状、ゲル状、半固形状、固体状等になったものも含まれる。

[0041] 本発明の医薬組成物中の本発明のマレイン酸塩の含有量としては、医薬組成物の全量に対して、通常は、約0.01~0.12重量%であり、好ましくは、約0.02~0.10重量%であり、より好ましくは、約0.02~0.05重量%である。このような範囲であれば、プリオン病の予防、改善、又は治療効果が十分に得られる。

[0042] 本発明の医薬組成物の投与方法は、特に限定されず、経口投与、非経口投与のいずれであっても良く、動脈内、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、直腸内へ、又は経呼吸、経皮、経鼻、経眼等による全身又は局所への投与等の方法により行うことができる。

前記投与方法は、好ましくは、静脈内投与等である。

[0043] 本発明の医薬組成物の投与量は、投与方法、剤型、投与対象の種、年齢、体重、病歴等に応じて適宜選択されるが、通常、1回当たり体重1kgあたり約1.0~500mgであり、好ましくは、約10~100mgである。

また、投与回数も、剤型、プリオン病の程度又は年齢等に応じて適宜選択され、1回投与とするか、ある間隔をおいて持続投与とすることもできる。

持続投与の場合、投与間隔は1日1回から数ヶ月に1回でも良い。

[0044] 本発明の医薬組成物に使用される基剤又は担体は、特に限定されないが、例えば、水、極性溶媒のような水性溶媒、多価アルコール、植物油、油性基剤等が挙げられる。注射剤の基剤又は担体としては、注射用蒸留水、生理用食塩水等が挙げられる。

基剤又は担体は、1種を単独で、又は2種以上を組み合わせ使用できる。

[0045] 本発明の医薬組成物に使用される薬学的に許容される添加剤としては、例えば、界面活性剤、香料又は清涼化剤、防腐剤、殺菌剤又は抗菌剤、pH調節剤、等張化剤、キレート剤、緩衝剤、安定化剤、抗酸化剤、及び粘稠化剤等が挙げられる。添加剤は、1種を単独で、又は2種以上を組み合わせ使用できる。

[0046] 薬学的に許容される添加剤の具体例を以下に例示する。

界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン（以下、「POE」ということもある）-ポリオキシプロピレン（以下、「POP」ということもある）ブロックコポリマー（例えば、ポロクサマー407、ポロクサマー235、ポロクサマー188）、エチレンジアミンのPOE-POPブロックコポリマー付加物（例えば、ポロキサミン）、POEソルビタン脂肪酸エステル（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート60、ポリソルベート80（TO-10等））、POE硬化ヒマシ油（例えば、POE(60)硬化ヒマシ油（HCO-60等））、POEヒマシ油、POEアルキルエーテル（例えば、ポリオキシエチレン（9）ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン（20）ポリオキシプロピレン（4）セチルエーテル）、及びステアリン酸ポリオキシルのような非イオン性界面活性剤；グリシン型両性界面活性剤（例えば、アルキルジアミノエチルグリシン、アルキルポリアミノエチルグリシン）、及びベタイン型両性界面活性剤（例えば、ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン、イミダゾリニウムベタイン）のような両性界面活性剤；並びにアルキル4級アンモニウム塩（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼト

ニウム)のような陽イオン界面活性剤等が挙げられる。尚、括弧内の数字は付加モル数を示す。

- [0047] 香料又は清涼化剤としては、例えば、カンフル、ボルネオール、テルペン類（これらはd体、l体又はd l体のいずれでも良い）、ハッカ水、ユーカリ油、ベルガモット油、アネトール、オイゲノール、ゲラニオール、メントール、リモネン、ハッカ油、ペパーミント油、及びローズ油のような精油等が挙げられる。
- [0048] 防腐剤、殺菌剤又は抗菌剤としては、例えば、塩化ポリドロニウム、塩酸アルキルジアミノエチルグリシン、安息香酸ナトリウム、エタノール、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、クロロブタノール、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、硫酸オキシキノリン、フェネチルアルコール、ベンジルアルコール、ビグアニド化合物（具体的には、ポリヘキサメチレンビグアニド又はその塩酸塩等）、及びグローキル（ローディア社製）等が挙げられる。
- [0049] pH調節剤としては、例えば、塩酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、トリエタノールアミン、モノエタノールアミン、ジイソプロパノールアミン、硫酸、及びリン酸等が挙げられる。
- [0050] 等張化剤としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、酢酸カリウム、酢酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、グリセリン、及びプロピレングリコール等が挙げられる。
- [0051] キレート剤としては、例えば、アスコルビン酸、エデト酸四ナトリウム、エデト酸ナトリウム、及びクエン酸等が挙げられる。

- [0052] 緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝剤；クエン酸、クエン酸ナトリウムのようなクエン酸緩衝剤；酢酸、酢酸カリウム、酢酸ナトリウムのような酢酸緩衝剤；炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウムのような炭酸緩衝剤；ホウ酸、ホウ砂のようなホウ酸緩衝剤；タウリン、アスパラギン酸及びその塩類（カリウム塩等）、イプシロン-アミノカプロン酸のようなアミノ酸緩衝剤等が挙げられる。
- [0053] 安定化剤としては、例えば、トロメタモール、ナトリウムホルムアルデヒドスルホキシレート（ロンガリット）、トコフェロール、ピロ亜硫酸ナトリウム、モノエタノールアミン、モノステアリン酸アルミニウム、及びモノステアリン酸グリセリン等が挙げられる。
- [0054] 抗酸化剤としては、例えば、アスコルビン酸、アスコルビン酸誘導体（アスコルビン酸-2-硫酸2ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸-2-リン酸マグネシウム、アスコルビン酸-2-リン酸ナトリウム等）、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム等の水溶性抗酸化剤等が挙げられる。
- [0055] 粘稠化剤としては、例えば、グアーガム、ヒドロキシプロピルグアーガム、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース系高分子化合物、アラビアゴム、カラヤガム、キサントガム、寒天、アルギン酸、 α -シクロデキストリン、デキストリン、デキストラン、ヘパリン、ヘパリノイド、ヘパリン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸塩（ナトリウム塩等）、コンドロイチン硫酸ナトリウム、デンプン、キチン及びその誘導体、キトサン及びその誘導体、カラギーナン、ソルビトール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリビニルメタクリレートのようなポリビニル系高分子化合物、ポリアクリル酸のアルカリ金属塩（ナトリウム塩、及びカリウム塩等）、ポリアクリル酸のアミン塩（モノエタノールアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩等）、ポリアクリル酸のアンモニウム塩のようなカルボキシ

ビニルポリマー、カゼイン、ゼラチン、コラーゲン、ペクチン、エラスチン、セラミド、流動パラフィン、グリセリン、ポリエチレングリコール、マクロゴール、ポリエチレンイミンアルギン酸塩（ナトリウム塩等）、アルギン酸エステル（プロピレングリコールエステル等）、トラガント末、並びにトリソプロパノールアミン等が挙げられる。

これらの添加剤は、医薬組成物のみならず、食品、食品添加剤、健康食品、サプリメントにも使用可能である。

[0056] 本発明の医薬組成物に使用される、マレイン酸塩以外の薬理活性成分又は生理活性成分としては、例えば、ビタミン類、アミノ酸類、抗菌薬成分又は殺菌薬成分、糖類、高分子化合物、セルロース又はその誘導体、及び局所麻酔薬成分等が挙げられる。これらの薬剤の具体例を以下に例示する。

[0057] ビタミン類としては、例えば、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール、塩酸ピリドキシン、フラビンアデニンジヌクレオチドナトリウム、リン酸ピリドキサール、シアノコバラミン、パンテノール、パントテン酸カルシウム、パントテン酸ナトリウム、アスコルビン酸、酢酸トコフェロール、ニコチン酸トコフェロール、コハク酸トコフェロール、コハク酸トコフェロールカルシウム、及びユビキノン誘導体等が挙げられる。

[0058] アミノ酸類としては、例えば、アミノエチルスルホン酸（タウリン）、グルタミン酸、クレアチニン、アスパラギン酸ナトリウム、アスパラギン酸カリウム、アスパラギン酸マグネシウム、アスパラギン酸マグネシウム・カリウム混合物、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸マグネシウム、イプシロン-アミノカプロン酸、グリシン、アラニン、アルギニン、リジン、 γ -アミノ酪酸、 γ -アミノ吉草酸、及びコンドロイチン硫酸ナトリウム等が挙げられる。これらはd体、l体又はdl体のいずれでも良い。

[0059] 抗菌薬成分又は殺菌薬成分としては、例えば、アルキルポリアミノエチルグリシン、クロラムフェニコール、スルファメトキサゾール、スルフイソキサゾール、スルファメトキサゾールナトリウム、スルフイソキサゾールジエタノールアミン、スルフイソキサゾールモノエタノールアミン、スルフイソ

メゾールナトリウム、スルフィソミジンナトリウム、オフロキサシン、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、塩酸ロメフロキサシン、及びアシクロビル等が挙げられる。

[0060] 糖類としては、例えば、単糖類、二糖類、具体的にはグルコース、マルトース、トレハロース、スクロース、シクロデキストリン、キシリトール、ソルビトール、マンニトール等が挙げられる。

[0061] 高分子化合物としては、例えば、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、デキストリン、デキストラン、ペクチン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ポリビニルアルコール(完全、または部分ケン化物)、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、マクロゴールおよびその薬学的に許容される塩類等が挙げられる。

[0062] セルロース又はその誘導体としては、例えば、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシエチルセルロース、ニトロセルロース等が挙げられる。

[0063] 局所麻酔薬成分としては、例えば、クロロブタノール、塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等が挙げられる。

[0064] <薬理活性試験>

本発明の医薬組成物の薬理活性試験は、正常型プリオンタンパク質の構造変換抑制活性を評価できる方法であれば特に限定されないが、通常は、被検物質の存在下、プリオン感染細胞が生成する異常型プリオンタンパク質の生成を検出する手段を用いることができる。前記プリオン感染細胞は、プリオンに感染しうる細胞に、公知の方法でプリオンを感染させることにより生成できる。異常型プリオンタンパク質の検出は、特定のタンパク質を検出可能な公知の方法を用いることができ、好ましくは定量的な検出方法が用いられる。前記定量的な検出方法としては、通常は抗体、核酸、これらの類似体(ペプチド、PNA等)等の特定のタンパク質を認識する手段と、蛍光体や放

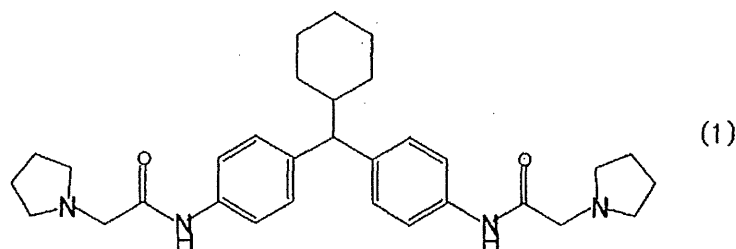
射線等で標識したタンパク質のイメージ解析手段（ELISA、ECL-plusウェスタンブロットング等）等の認識されたタンパク質を定量化する手段とを組み合わせで行われる。

[0065] 薬理活性試験は、通常は、マウス神経細胞株にプリオンを感染させ、次いで種々の濃度で被検物質（薬剤）を添加した培地で一定期間培養した後、タンパク質を回収して異常型プリオンタンパク質を抗体等で検出し、イメージ解析等により定量化する方法等を利用することができる。前記試験において、異常型プリオンタンパク質の生成量が少ないほど、プリオンタンパク質の構造変化抑制活性に優れ、プリオン病の予防、改善又は治療に高い効果を奏すると評価できる。

[0066] 本発明のマレイン酸塩及び医薬組成物の抗プリオン活性は、後述のIC₅₀（50%阻害濃度）に基づけば、IC₅₀は好ましくは1.0 μM以下であり、より好ましくは0.5 μM以下であり、さらに好ましくは0.4 μM以下である。本発明において、IC₅₀とは、マレイン酸塩を添加しないときのプリオンタンパク質の濃度を100%としたときの、プリオンタンパク質が50%に減少するマレイン酸塩の有効濃度のことである。

[0067] 本発明は、下記式（1）で表される化合物と、マレイン酸とを接触させることを特徴とする本発明のマレイン酸塩の工業的に有利な新規製造方法をも含有するので、該製造方法は、上述したマレイン酸塩の取得方法として当業者であれば実施できるように詳細に開示されている。

[化6]



実施例

[0068] 本発明を以下の実施例及び比較例によって具体的に説明するが、本発明は

これらによって限定されるものではない。

[0069] <有機酸塩の形成>

(実施例1)

アルゴン雰囲気下、アニリン890g(9.5mol)とシクロヘキサンカルボキシアルデヒド270g(2.4mol)を混合させたのち、室温下で濃塩酸22.7g(0.24mol)を滴下した。反応液を140°Cで5時間加熱還流したのち、反応液にジエチレングリコール1.1kg、水酸化ナトリウム水溶液10gを加え、余剰のアニリンを蒸留により留去した。反応液を2N塩酸2.6kgにより抽出し、トルエン1.4Lにより洗浄を行った。水層に5%水酸化ナトリウム水溶液を加え、析出した結晶を回収し、真空乾燥することにより、粗結晶A、257g(yield: 38%, mp: 104~107°C)を得た。

粗結晶Aの¹H核磁気共鳴スペクトルの結果は、以下の通りであった。

<粗結晶A>

¹H NMR(CDCl₃, δ) 7.00 (d, 4H, Ar-H), 6.58 (d, 4H, Ar-H), 4.12 (d, 1H, CH), 1.95-1.93 (m, 1H, CH), 1.63 (m, 4H, CH₂), 1.18-1.15 (m, 4H, CH₂), 0.83 (q, 2H, CH₂)

従って、粗結晶Aは、4,4' - (シクロヘキシルメチレン) ジアニリンであることが確認された。

[0070] アルゴン雰囲気下、粗結晶A、257g(0.92mol)をジクロロメタン2.6Lに溶解させ、トリエチルアミン204g(2.0mol)を加えた。これに、氷冷下、クロロアセチルクロリド227g(2.0mol)を滴下し、18時間攪拌した。析出した結晶を回収し、ジクロロメタンで洗浄した。これをTHF/CPME混合溶液を用いて再結晶し、結晶B、283g(yield: 71%, mp: 228°C)を得た。

ピロリジン204g(2.87mol)をTHF2.8Lに溶解させ、室温下、結晶B、283g(0.65mol)を分割添加し、19時間攪拌させた。反応液を酢酸エチル6.0Lで抽出、イオン交換水3.4Lで洗浄を行った。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、減圧濃縮し粗結晶を得た。これをTHF/ジイソプロピルエーテル混合溶液を用いて再結晶し、N,N' - [(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2

-(1-ピロリジニル)アセトアミド]の結晶、274g(yield: 83%、mp: 167°C)を得た。

結晶Bの¹H核磁気共鳴スペクトルの結果は、以下の通りであった。

<結晶B>

¹H NMR(CDCl₃, δ) 8.14 (br, 2H, CH₂), 7.41 (d, 4H, Ar-H), 7.24 (d, 4H, Ar-H), 4.16 (s, 4H, CH₂Cl), 3.46 (d, 1H, CH), 2.04 (q, 1H, CH), 1.57-1.55 (m, 4H, CH₂), 1.22-1.14 (m, 4H, CH₂), 0.85 (q, 2H, CH₂)

従って、結晶Bは、N,N' - [(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-クロロアセトアミド)であることが確認された。

また、N,N' - [(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]の¹H核磁気共鳴スペクトルの結果は、以下の通りであった。

<N,N' - [(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]>

¹H NMR(CDCl₃, δ) 8.99 (br, 2H, NH), 7.45 (d, 4H, Ar-H), 7.21 (d, 4H, Ar-H), 3.43 (d, 1H, CH), 3.24 (s, 4H, C(O)CH₂), 2.67 (br, 8H, NCH₂), 2.08-2.00 (m, 1H, CH), 1.83 (quint, 8H, CH₂), 1.67-1.59 (m, 4H, CH₂), 1.24-1.12 (m, 4H, CH₂), 0.84 (q, 2H, CH₂)

[0071] N,N' - [(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]100g(0.2mol)をTHF 2.0Lに溶解させた。氷冷下、マレイン酸51g(0.43mol)のTHF (300mL)溶液を滴下し、滴下終了後、室温下、20時間攪拌した。析出した結晶を回収し、エタノール/イオン交換水混合溶液(30:1)を用いて再結晶し、目的のN,N' - [(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩130.8g (yield 89.5%, mp 145.1°C)を得た。

N,N' - [(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩の¹H核磁気共鳴スペクトル(TMS内部標準)の結果は、以下の通りであった。

<N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩>

¹H NMR(dmsO-d₆, δ) 10.38 (br, 2H, NH), 7.45 (d, 4H, Ar-H), 7.30 (d, 4H, Ar-H), 6.02 (s, 4H, CH), 4.14(s, 4H, C(O)CH₂), 3.47 (d, 1H, CH), 3.30 (br, 8H, NCH₂), 2.13-2.10 (m, 1H, CH), 1.93 (quint, 8H, CH₂), 1.59 (m, 3H, CH₂), 1.46-1.43 (m, 2H, CH₂), 1.19-1.13 (m, 3H, CH₂), 0.84-0.78 (q, 2H, CH₂)

本マレイン酸塩は、中和滴定によりマレイン酸が2分子結合した塩と推定されたので、2マレイン酸塩(分子式: C₃₉H₅₀N₄O₁₀)として元素分析を行った。その結果は以下の通りで、計算値と実測値の差がいずれも±0.3%以内であったので、本マレイン酸塩は、マレイン酸が2分子結合した塩であることが判明した。

計算値: C, 63.75%; H, 6.86%; N, 7.62%

実測値: C, 63.48%; H, 6.89%; N, 7.48%

[0072] (比較例1)

前記のN,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]、100g(0.198mol)をTHF2.0Lに溶解させた。氷冷下、コハク酸51.4g(0.435mmol)のTHF溶液0.9Lを滴下し、滴下終了後、室温下、24時間攪拌した。析出した結晶を回収し、THFを用いて再結晶し、目的のN,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]コハク酸塩74.2g(yield: 50.5%, mp: 145°C)を得た。

N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]コハク酸塩の¹H核磁気共鳴スペクトルの結果は、以下の通りであった。

<N,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]コハク酸塩>

¹H NMR(CDCl₃, δ) 9.18(br, 2H, NH), 7.45 (d, 4H, Ar-H), 7.19 (d, 4H, Ar

-H), 3.72 (d, 1H, CH), 2.78(s, 4H, C(O)CH₂), 2.58 (br, 8H, NCH₂), 2.07-2.04 (m, 1H, CH), 1.88 (quint, 8H, CH₂), 1.65-1.57 (m, 5H, CH₂), 1.23-1.15 (m, 3H, CH₂), 0.86-0.83 (m, 2H, CH₂)

[0073] <有機酸塩の結晶性のスクリーニング>

(試験例1)

実施例1のマレイン酸を、塩酸、硫酸、リン酸、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸、酢酸、乳酸、サリチル酸、マンデル酸、フマル酸又はベンゼンスルホン酸に変更し、酸塩の合成スケールを実施例1の0.01倍のスケールに変更し、再結晶溶媒を表1に記載の各溶媒に変更した以外は、実施例1と同様にして各酸の酸塩を作製し、各塩の結晶性を評価した。これらの塩と実施例1の0.01倍のスケールで作製したマレイン酸塩及び比較例1の0.01倍のスケールで作製したコハク酸塩のスクリーニングの結果を、表1に示す。その結果、酢酸、コハク酸、及びマレイン酸が候補として残った。しかし、実際に実施例1と同じ合成スケールにスケールアップして合成した結果、酢酸塩は乾固により、酢酸が抜けていき、すなわち容易に離脱していき、塩形成をしないことが分かった。

[0074]

[表1]

表1. 各有機酸塩の結晶性

酸	溶媒							
	メタノール	エタノール	1-プロパノール	イソプロパノール	1-ペンタノール	アセトン	アセトニトリル	THF
塩酸	×	×	×	×	×	×	×	×
硫酸	×	×	×	×	×	×	×	×
リン酸	×	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲
クエン酸	×	▲	▲	○	○	▲	▲	▲
リンゴ酸	×	×	×	▲	▲	▲	○	×
コハク酸	×	×	×	×	×	×	○	◎
酒石酸	×	▲	○	▲	▲	▲	▲	○
酢酸	×	×	×	○~◎	×	×	○	×
乳酸	×	×	×	○	×	×	○	×
サリチル酸	×	×	×	×	×	×	×	×
マレイン酸	×	◎	×	×	×	×	×	○
マンデル酸	×	○	×	○	×	○	○	×
フマル酸	×	×	×	▲	×	○	×	×
ベンゼンスルホン酸	×	×	×	○	×	○	×	○

◎: 結晶良好 ○: 結晶確認 ▲: 沈殿生成 ×: 変化なし

[0075] <有機酸塩の苛酷試験>

(実施例2)

実施例1で得られたN,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩結晶をシャーレーに入れ、該シャーレーを温度40±2℃、湿度75±5%の恒温恒湿槽に2週間置いて苛酷試験を行なった後のマレイン酸塩の状態を観察した。2週間の苛酷試験後のマレイン酸塩の写真を図1に示す。

2週間苛酷試験後のマレイン酸塩は、白色結晶であり粉体の形状を留めていたことから、本発明のマレイン酸塩は、結晶性が高く、安定性が高いものであることがわかった。さらに前記温度及び条件で苛酷試験を実施し、1ヶ月苛酷試験後のマレイン酸塩を得た。該1ヶ月苛酷試験後のマレイン酸塩も、粉体の白色結晶であり、粉体の形状を留めていた。

[0076] (比較例2)

比較例1で得られたN,N' -[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]コハク酸塩結晶をシ

シャーレーに入れ、該シャーレーを温度 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $75 \pm 5\%$ の恒温恒湿槽に2週間置いて苛酷試験を行なった後のコハク酸塩の状態を観察した。

2週間の苛酷試験後のコハク酸塩の写真を図2に示す。

2週間苛酷試験後のコハク酸塩は、アメ状であり粉体の形状を留めていなかったことから、コハク酸塩は吸湿性が高く、実施例2で示したマレイン酸塩と比較して、結晶性及び安定性が劣ることがわかった。さらに前記温度及び条件で苛酷試験を実施し、1ヶ月苛酷試験後のコハク酸塩を得た。

[0077] (実施例3)

前記の2週間苛酷試験後及び1ヶ月苛酷試験後のマレイン酸塩と苛酷試験実施前のマレイン酸塩(実施例1で得られたマレイン酸塩)のX線回折データを、X線回折装置(製品名:D8ADVANCE)を用いて、下記の条件により、常法に従って測定した。

X線 : Cu K α 線 (1.54 Å)

ターゲット : Cu

X線管電流 : 45 mA

X線管電圧 : 45 kV

走査範囲 : $2\theta = 4.000 \sim 70.134^\circ$

ステップ : $2\theta = 0.021^\circ$

苛酷試験実施前、2週間苛酷試験後及び1ヶ月苛酷試験後のマレイン酸塩の測定結果を、それぞれ図3、図4及び図5に示す。図3～5において、Intensityとは回折強度を示し、2-Theta-Scaleとは回折角(2θ ($^\circ$))を示す。この結果は、2週間苛酷試験後及び1ヶ月苛酷試験後のマレイン酸塩のX線回折パターンが、苛酷試験実施前のマレイン酸塩のX線回折パターンと比較して変化がなく、極めて安定な結晶であることを示している。従って、本発明のマレイン酸塩は結晶性が高く、安定性が高いものであることを示している。

[0078] (比較例3)

前記の2週間苛酷試験後及び1ヶ月苛酷試験後のコハク酸塩と苛酷試験実

施前のコハク酸塩（比較例1で得られたコハク酸塩）のX線回折データを、実施例3と同様の方法を用いてX線回折装置により測定した。苛酷試験実施前、2週間苛酷試験後及び1ヶ月苛酷試験後のコハク酸塩の測定結果を、それぞれ図6、図7及び図8に示す。図6～8において、Intensityとは回折強度を示し、2-Theta-Scaleとは回折角（ 2θ （°））を示す。この結果は、2週間苛酷試験後及び1ヶ月苛酷試験後のコハク酸塩のX線回折パターンが、苛酷試験実施前のコハク酸塩のX線回折パターンと比較して変化しており、不安定な結晶であることを示している。

以上の結果から、本発明のマレイン酸塩は、結晶性及び安定性に、驚くべきことに最も優れたものであることがわかる。尚、該化合物の遊離化合物よりも、対応するマレイン酸塩が、顕著に結晶性及び安定性に優れていることも知見した。

[0079] <投与試験>

（試験例2）

実施例1で得られたN,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩を注射用生理食塩液に溶解し、濃度が50mg/mL、pH3.79の投与液を調整した。投与液の調整は紫外線をカットした蛍光灯下、投与当日に行った。

得られた投与液を、試験動物としてカニクイザル（雄雌3～5歳齢、体重3～4kg）を用い、ディスプレイブルシリンジおよび経口カテーテルにより、胃内へ強制経口投与（投与回数1回）した。投与液量は5mL/kgとし、投与日に測定した体重に基づき算出した。投与時点から1、2、4、8及び24時間後に、橈側皮静脈または伏在静脈から採血量約0.5mL/時点を採取した。なお、抗凝固剤としてヘパリン（ナトリウム塩）を用いた。

採取した血液を遠心分離（約10000×g、3分、約4℃）し、個体毎に血漿を得た。得られた血漿中のN,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩濃度をHPLC測定により測定した。結果を表2に示す。表2においてB

LQとは、測定可能な下限値より低い濃度 (<5 ng/mL) であることを示す。この結果から、本発明のマレイン酸塩が、血中においても分解されることなく、安定性が高いことがわかる。

[0080] [表2]

表2. マレイン酸塩の血漿中濃度<経口投与>

投与量 (mg/kg)	試験動物 番号	血漿中濃度(ng/mL)				
		1時間後	2時間後	4時間後	8時間後	24時間後
250	10101	8.27	7.23	8.72	BLQ	BLQ
	50101	9.10	12.6	11.7	6.39	BLQ
	Mean	8.69	9.92	10.2	BLQ	BLQ

[0081] (試験例3)

実施例1で得られたN,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩を注射用生理食塩液に溶解し、濃度が12.5mg/mL及び0.2mg/mLの投与液を調整した。投与液の調整は紫外線をカットした蛍光灯下、投与当日に行った。pHは、濃度12.5mg/mLの投与液では3.74、濃度0.2mg/mLの投与液では4.47であった。

得られた2種の濃度の投与液を、試験動物としてカニクイザル(雌3~5歳齢、体重2~4Kg)を用い、ディスプレイブルシリンジおよび注射針(24G)を用いて伏在静脈より投与速度0.5mL/min又は2mL/minにて静脈内投与(投与回数1回)した。投与時点から5分、2、4、8、24時間後に、採血部位橈側皮静脈または伏在静脈から採血量約0.5mL/時点を採取した。投与液量は投与日に測定した体重に基づき算出した。なお、抗凝固剤としてヘパリン(ナトリウム塩)を用いた。

採取した血液を遠心分離(約10000×g、3分、約4℃)し、個体毎に血漿を得た。得られた血漿中のN,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩濃度をHPLC測定により測定した。結果を表3に示す。この結果からも、本発明のマレイン酸塩が、血中においても分解されることなく、安定性が高いことがわかる。

[0082]