

[表3]

表3. マレイン酸塩の血漿中濃度<静脈内投与>

投与量 (mg/kg)	試験動物 番号	血漿中濃度(ng/mL)				
		5分後	2時間後	4時間後	8時間後	24時間後
100	50201	2120	983	628	582	86.9
10	50301	161	33.2	19.1	9.85	5.57

[0083] <異常型プリオンタンパク質の定量>

(試験例4)

マウス視床下部神経細胞系列GT1は、マウスプリオンに感染しうる。本発明のマレイン酸塩の抗プリオン作用を評価する目的で、GTFK-1細胞系列を用いた(N. Nishida et al., J. Virol, 74, 320-325 (2000))。これらはGSS由来の(O. Milhavet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97, 13937-13942 (2000))マウス適合プリオンFukuoka-1株である。

GTFK細胞を、37℃下、5%二酸化炭素で、ダルベッコ培地に10%牛胎児血清、50U/mLのペニシリンG、50mg/mLの硫酸ストレプトマイシンを加えた培養液で培養した。コンフルエントとなった細胞を、一週間毎に、0.25%トリプシンと1mMEDTA(エチレンジアミン四酢酸)を用いて継代した。細胞の濃度は、 0.5×10^5 cells/mLに調整した。

次いで、実施例1のマレイン酸塩(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、10mMの濃度でDMSOに溶解した。約 3×10^5 の細胞を、6穴プレートに落種し、24時間後に、培養液を含む前記マレイン酸塩で培養液を置換した。この培養液とDMSO濃度が同じである培養液を、対照として使用した。前記マレイン酸塩を添加してから3日後、細胞を、150μLのトリトン-D0C溶解液で溶解した。11200×gで遠心した後、上澄み液中のタンパク質濃度をBCAプロテインアッセイキット(Pierce社製)で測定し、溶解液で1mg/mLに調整して試料を得た。

得られた試料を、 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のプロテイナーゼKで、 37°C で30分間加水分解した後、反応を $3\ \text{mM}$ の阻害剤（ベファブロック）で停止させた。その後、試料を $21952\times g$ で45分間、 4°C で遠心し、沈殿物を試料緩衝液に溶かして煮沸させた後、 15% ポリアクリルアミドで、 $180\ \text{V}$ で20分間電気泳動した。その後、ウエスタンブロットを行い、蛋白質をPVD F膜（Immobilon-P、ミリポア社製）に転写した。異常型プリオンタンパク質検出のための一次抗体としては、M-20抗体（SANTA CRUZ社製）を使用した。シグナルはSuper Signal液（Pierce社製）で可視化し、LAS-1000 UV解析装置（LAS-1000 UVmini、富士フイルム社製）でスキャンした。全異常型プリオンタンパク質バンドの濃度を測定し、Multi Gauge（ソフトウェア名）を用いて比較した。実施例1のマレイン酸塩を添加しないときの異常型プリオンタンパク質の濃度を 100% とし、異常型プリオンタンパク質が 50% に減少する該マレイン酸塩の有効濃度（IC50）を、該マレイン酸塩の添加濃度を 0.05 、 0.1 、 0.3 、 0.5 、 0.8 、 1.2 、 1.5 、 2.0 及び $5.0\ \mu\text{M}$ として細胞に添加することにより求めた。その結果、実施例1のマレイン酸塩のIC50は、 $0.46\pm 0.20\ \mu\text{M}$ と低い値を示し、本発明のマレイン酸塩が、プリオン病の予防、改善又は治療に有効な化合物であることが示された。

[0084] <ラットにおける単回投与後の薬物動態試験>

（試験例5）

実施例1で得られた $\text{N,N}'$ -[(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 $29.9\ \text{mg}$ に局方生理食塩液（株式会社大塚製薬工場製） $100\ \text{mL}$ を加え、スターラーで攪拌しつつ溶解させ、 $\text{N,N}'$ -[(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]換算濃度が $0.2\ \text{mg}/\text{mL}$ の、急速静脈投与及び経口投与用の投与液を得た、この投与液を $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過後、滅菌した。得られた液を $60\ \text{mL}$ 採取し、局方生理食塩液 $90\ \text{mL}$ を加えて希釈して、 $0.08\ \text{mg}/\text{mL}$ （ $\text{N,N}'$ -[(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]換算濃度）とした。

ル)アセトアミド]換算濃度)の、持続静脈内投与用の投与液を得た。尚、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。また、上記2種の投与液のpHは、ともに4.68であった。

[0085] 雄性Crl:CD(SD)ラットを8週齢で購入後(日本チャールス・リバー株式会社より購入)、温度19.0~25.0°C、相対湿度35.0~75.0%、12時間周期の照明(7:00~19:00)の条件下で、固形飼料(CR-LPF:オリエンタル酵母工業製、放射線滅菌済)及び飲用水(5µmフィルター濾過後、紫外線照射した水道水)を自由に摂取させ飼育した。飼育開始後、動物個体毎に一般状態を5日以上毎日観察し、健康状態が良好であることを確認して検疫した。動物入荷日及び検疫終了日に体重測定を行い、検疫終了時の体重が入荷時の体重よりも増加し、順調に発育していることを確認した。尚、検疫終了時の体重は、平均体重±20%以内であることを確認した。検疫終了後も投与日(投与直前)まで毎日一般状態を観察し、馴化を継続した。

[0086] 急速静脈内投与は、上記投与液を、上記検疫及び馴化をしたラット(投与時の週齢:8週齢)に、翼付注射針(25G×3/4、ニプロ社製)及びディスプレイ注射筒(2.5mL、テルモ社製)を用いて1mL/minの投与速度で尾静脈内に投与(単回投与)することにより行った。尚、投与液量は、投与日に測定した体重に基づいて算出し、1mg/kgであった。

[0087] 持続静脈内投与は、上記投与液を、上記検疫及び馴化をしたラット(投与時の週齢:8週齢)に、大腿静脈に挿入されたカテーテルよりシリンジポンプ(TE-312、テルモ社製)及びディスプレイ注射筒(50mL、テルモ社製)を用いて5.43mL/kg/hの投与速度で投与(単回投与)することにより行った。投与速度は投与日に測定した体重に基づいて算出した。投与直前に生理食塩液でフラッシングを行い、カテーテル内液を排出した。投与終了後、カテーテル内での血液凝固を防ぐため、カテーテル内にヘパリン・グリセリン溶液(グリセリン6容量に対しヘパリンナトリウム注射液(1000単位)4容量を加えた後(最終ヘパリンナトリウム濃度:400単位/mL)、フィルター滅菌を行い、冷蔵保存した液)を充填させた。尚、投与液量は投与日に測定した体重に基

づいて算出し、10mg/kgであった。

[0088] 経口投与は、上記投与液を、上記検疫及び馴化をしたラット（投与時の週齢：8週齢）に、経口ゾンデ（フチガミ器械社製）をディスプレイ注射筒（2.5mL、テルモ社製）に装着し、投与液量及び投与器材のデッドボリューム分の投与液を投与器材に充填し、強制経口投与（単回投与）した。尚、投与液量は投与日に測定した体重に基づいて算出し、1mg/kgであった。

尚、上記急速静脈内投与、持続静脈内投与及び経口投与の投与量はいずれも、 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]換算用量である。

[0089] 上記した急速静脈内投与、持続静脈内投与及び経口投与のそれぞれにおいて、投与終了時点から5分、2時間、4時間、8時間、24時間及び48時間後に、無麻酔下で鎖骨下静脈からヘパリンナトリウム処理した注射針及びシリンジを用いて、それぞれ約0.25mL（投与後8時間までの場合）又は約0.45mL（投与後24時間以降の場合）を採血し、マイクロテストチューブに移した。血液0.05mL（投与後8時間までの場合）又は0.1mL（投与後24時間以降の場合）をコンバストパットに分取し（各n=1）、後述する方法により放射能を測定して血液中放射能濃度を求めた。血液の残部は遠心分離機（GF15D2、日立工機社製）を用いて遠心分離（4°C、12000rpm×5min）し、血漿を採取した。得られた血漿0.05mL（投与後8時間までの場合）又は0.1mL（投与後24時間以降の場合）をコンバストパットに分取し（各n=1）、後述する方法により放射能を測定して血漿中放射能濃度を求めた。血液中放射能濃度及び血漿中放射能濃度の結果を、表4及び図9に示す。

また、血液及び血漿中放射能濃度推移を、薬物動態解析ソフトウェアPhoenix WinNonlin 6.3(Pharsight Corporation as part of Certara)のNon-compartmental analysisにより解析し、薬物動態パラメータを算出した。その結果を表4に示す。

尚、表4及び図9において、Bolusとは急速静脈内投与を、Infusionとは持続静脈内投与を、POとは経口投与を示す。

[0090] (放射能の測定)

tSIE(transformed Spectral Index of External standard)法によりクエンチング補正を行う液体シンチレーションカウンター(Tri-Carb 2300TR、PerkinElmer社製)を用い、放射能を測定した。測定は各バイアル当たり5分間、1回とし、バックグラウンド値は測定試料と同一のシンチレーションカクテルのみ、またはコンバストパッド(PerkinElmer社製)を燃焼して調整したバックグラウンドバイアルを5分間、1回測定して得られた放射能測定値とした。このバックグラウンド値を差し引いてネットのカウント値とした。尚、放射能の検出限界はバックグラウンド値の2倍とした。

サンプルオキシダイザー(Model 307型、PerkinElmer社製)により燃焼処理を行って放射能を測定した際は、あらかじめ放射能の回収率(n=3、許容範囲90.0%以上)を測定した。また、最終燃焼後にも同様に放射能の回収率(n=3)を測定した。尚、サンプルオキシダイザーによる燃焼処理は、発生した¹⁴C₂O₂をCO₂吸収剤(Carbo-Sorb、PerkinElmer社製:6mLとして設定)に回収させ、Permafluor E+(PerkinElmer社製:9mLとして設定)を混合することにより行った。尚、血液及び血漿は、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

[0091] 血液中放射能濃度及び血漿中放射能濃度は、上記放射能測定値を用い、薬物動態試験支援システムADMESUPPORT Ver2.1(富士通株式会社製)を用いて算出した。当該システムの情報には、群に関する情報、核種に関する情報、動物購入に関する情報、投与に関する情報、採取項目に関する情報及び測定予定に関する情報を登録した。

血液中放射能濃度及び血漿中放射能濃度は、実施例1で得られたマレイン酸塩のフリー体(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])換算濃度として算出した。

[0092]

[表4]

表4. ラットへのマレイン酸塩単回投与後の血液及び血漿中の放射能濃度及び薬物動態パラメータ

投与時間/ 薬物動態パラメータ		放射能濃度 (ng eq./mL)					
		血液中濃度			血漿中濃度		
		Bolus (1mg/ kg)	Infusion (10mg/kg for 23h)	PO (1mg/ kg)	Bolus (1mg/ kg)	Infusion (10mg/kg for 23h)	PO (1mg/ kg)
5分	312.7	897.8	1.8	52.1	56.2	ND	
2時間	79.2	554.0	20.4	8.2	44.6	19.0	
4時間	57.6	477.4	39.5	7.6	37.4	33.8	
8時間	45.3	445.7	26.0	6.0	37.0	20.5	
24時間	45.6	376.6	11.1	4.2	30.6	6.2	
48時間	38.5	348.2	7.1	3.7	22.8	3.0	
C_{max} (ng eq./ mL)	最高血液又は血漿中 放射能濃度	---	---	39.5	---	---	33.8
t_{max} (h)	最高血液又は血漿中 放射能濃度到達時間	---	---	4.0	---	---	4.0
C_0 (ng eq./ mL)	時間0に外挿した 初期血漿中放射能濃度	331.1	---	---	56.3	---	---
$t_{1/2}$ (h)	消失半減期	98.8	99.3	18.7	46.1	62.2	12.9
AUC_{0-t} (ng eq.· h/mL)	血液又は血漿中 放射能濃度 一時間曲線下面積	2424	19527	706	268	1500	472
AUC_{0-inf} (ng eq.· h/mL)	血液又は血漿中 放射能濃度 一時間曲線下面積	7956	69626	896	514	3562	527
GL_{total} (mL/h/g)	全身クリアランス	128	145	---	1947	2845	---
GL_{total}/F (mL/h/g)	見かけの 全身クリアランス	---	---	1120	---	---	1969
$V_{d_{ss}}$ (mL/kg)	定常状態の分布容積	17445	19037	---	12515 5	214311	---
V_{d_z}/F (mL/kg)	見かけの 終末相の分布容積	---	---	30263	---	---	36594
MRT_{0-inf} (h)	平均滞留時間	138.4	132.1	30.3	64.4	77.6	20.6
Fa (%)	吸収率	---	---	11.3	---	---	102.5

$t_{1/2}$ は、4時間～48時間の濃度を使用して計算した値

ND:未検出(Not detected)

---:非適用(Not detected)

Fa=(POにおける AUC_{0-inf})/(Bolusにおける AUC_{0-inf})×100

[0093] 表4及び図9の結果から、ラットへの急速静脈内投与において、血液中放射能濃度は投与後5分後から投与後48時間後まで血漿中放射能濃度の6～11倍高い値で推移したことから、本発明のマレイン酸塩は血球移行性が高いと考えられる。

また、持続静脈内投与においても、血液中放射能濃度は血漿中放射能濃度より12～16倍高い値で推移した。

これらの結果から、本発明のマレイン酸塩は、注射による静脈内投与に特に適していると考えられる。

[0094] (試験例6)

(組織中放射能濃度の測定)

実施例1で得られたマレイン酸塩をラットに単回投与後48時間における組織中放射能濃度を表6に、血球移行率(T)及び血漿中放射能濃度に対する血液中放射能濃度の比(R_b)を表7に示す。組織中放射能濃度、血球移行率(T)及び血漿中放射能濃度に対する血液中放射能濃度の比(R_b)は、以下のようにして求めた。

上記した急速静脈内投与、持続静脈内投与又は経口投与したラットを、投与48時間後にイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、後大静脈から可能な限り採血した後、腹大動脈を切断放血して安楽死させ、下記の表5の組織を摘出した。尚、表5において、組織A~Dはそれぞれ、A：組織の全量を採取してその一部を放射能測定に供した組織、B：組織の全量を採取してその全量を放射能測定に供した組織、C：組織の一部を採取してその一部を放射能測定に供した組織、D：組織の一部を採取してその全量を放射能測定に供した組織である。

[0095] [表5]

表5. 採取試料

—	血液	B	胸腺	B	脾臓
—	血漿	B	心臓	B	精巣
B	大脳	B	肺	D	腸間膜リンパ
B	小脳	A	肝臓	C	骨格筋(大腿筋)
B	脳下垂体	B	腎臓	C	骨(大腿骨)
B	顎下体	B	副腎	C	白色脂肪(精巣周辺)
B	甲状腺	B	脾臓	—	脳脊髄液

[0096] 採取した組織について、試験例5に記載した方法で放射能を測定して組織中放射能濃度を求めた。

また、血液試料1mLをコンバストパッドに分取し(n=1)、試験例5に記載した方法で放射能を測定して血液中放射能濃度を求めた。また、血液試料の一部を毛細管に採取し(n=1)、遠心分離機(HC-12A、トミー精工社製)を用いて

遠心分離(12000rpm×5min)してヘマトクリット値を測定した。血液試料残部は、遠心分離機(CF7D2、日立工機社製)を用いて遠心分離(4℃、3000rpm×10min)して、その上清を血漿試料とした。血漿試料1mLをコンバスパッドに分取し(n=1)、試験例5に記載した方法で放射能を測定して血漿中放射能濃度を求めた。

また、血漿中放射能濃度に対する各組織中放射能濃度の比率(T/P比)を算出した。血液中放射能濃度(C_b)、血漿中放射能濃度(C_p)及びヘマトクリット値(H_t)の測定結果から、次式により放射能の血球移行率(T)及び血漿中放射能濃度に対する血液中放射能濃度の比(R_b 値)を算出した。尚、T/P比、T及び R_b 値の算出には、Microsoft Excel 2010(Microsoft Corporation)を用いた。T及び R_b 値は、それぞれ、以下の式で表される。

$$T(\%) = (1 - C_p/C_b \times (100 - H_t) / 100) \times 100$$

$$R_b = C_b/C_p$$

[0097] また、採取した組織について、上記A～Dに分類した組織は、生理食塩液で洗浄して濾紙片により付着水分を除いた後、それぞれ以下のように処理した。

- ・組織A：組織重量を測定し、解剖用剪刀により粗砕した後、約0.5gをコンバスパッドに分取、秤量して(n=1)、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

- ・組織B：コンバスパッドに採取して組織重量を測定した後、全量をサンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

- ・組織C：組織の一部を採取した。白色脂肪については約0.1g(n=1)を、他の組織については約0.3g(n=1)をコンバスパッドに分取、秤量して、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

- ・組織D：組織の一部をコンバスパッドに分取、秤量して、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

また、脳脊髄液については、マイジェクター(テルモ社製)を用いて一部(n=1)をコンバスパッドに分取、秤量して、サンプルオキシダイザーにより

燃焼処理した。

[0098] [表6]

表6. ラットへのマレイン酸塩単回投与から48時間後の組織中放射能濃度

組織	放射能濃度 (ng eq./mL) (組織中の放射能濃度/血漿中の放射能濃度の比)		
	急速静脈内投与 (1mg/kg)	持続静脈内投与 (10mg/kg for 23h)	経口投与 (1mg/kg)
血液	39.7 (10.18)	407.9 (19.52)	10.00 (4.55)
血漿	3.9 (1.00)	20.9 (1.0)	2.2 (1.00)
大脳	72.3 (18.54)	292.1 (13.98)	17.1 (7.77)
小脳	19.3 (4.95)	295.7 (14.15)	10.1 (4.59)
脳下垂体	4317.8 (1107.13)	52196.9 (2497.46)	385.4 (175.18)
顎下腺	2855.0 (732.05)	27325.5 (1307.44)	946.2 (430.09)
腸間膜リンパ	5855.8 (1501.49)	69303.2 (3315.94)	2152.7 (978.50)
甲状腺	2951.7 (756.85)	32876.4 (1573.03)	738.3 (335.59)
胸腺	1826.8 (468.41)	14576.6 (697.44)	278.2 (126.45)
心臓	1102.7 (282.74)	13746.9 (657.75)	213.8 (97.18)
肺	8426.7 (2160.69)	161436.4 (7724.3)	1539.5 (699.77)
肝臓	3094.2 (793.38)	37954.5 (1816.00)	1312.2 (596.45)
副腎	13870.9 (3556.64)	95579.5 (4573.18)	2366.3 (1075.59)
腎臓	5296.4 (1358.05)	62073.2 (2970.01)	495.0 (225.00)
脾臓	13562.1 (3477.46)	201967.0 (9663.49)	1230.7 (559.41)
膵臓	2137.0 (547.95)	17592.2 (841.73)	325.9 (148.14)
精巣	62.1 (15.92)	472.4 (22.60)	16.2 (7.36)
骨格筋	518.6 (132.97)	4084.8 (195.44)	139.2 (63.27)
骨	712.9 (182.79)	1502.5 (71.89)	86.9 (39.50)
白色脂肪	179.7 (46.08)	2390.7 (114.39)	140.7 (63.95)
脳脊髄液	ND (NC)	1.6 (0.08)	ND (NC)

ND:未検出 (Not detected) (<0.7 ng eq./g)

NC:未計算 (Not calculated)

[0099] [表7]

表7. ラットへのマレイン酸塩単回投与から48時間後の血漿中における、血球移行率及び血液中放射能濃度の比率

投与経路	ヘマトクリット値 (H _i)	放射能濃度 (ng eq./mL)		血球 移行率(T) (%)	血液中 放射能濃度 /血漿中 放射能濃度 (R _B)
		血液中放射能 濃度(C _b)	血漿中放射能 濃度(C _p)		
静脈内投与	36.0	39.7	3.9	93.7	10.18
持続静脈内投与	32.0	407.9	20.9	96.5	19.52
経口投与	36.5	10.0	2.2	86.0	4.55

[0100] 表6及び表7の結果から、いずれの投与経路においても、投与後48時間に、脳下垂体、顎下腺、腸間膜リンパ、甲状腺、胸腺、肺、肝臓、副腎、腎臓、脾臓及び膵臓において、血漿中放射能濃度の100倍以上の放射能が確認され

たことから、本発明のマレイン酸は組織への移行性が高いものであると考えられる。

また、大脳及び小脳においては、血液中放射能濃度よりも高い放射能が確認されたことから、本発明のマレイン酸塩は中枢神経系への移行性も高いと考えられる。

[0101] <カニクイザルにおける単回投与後の薬物動態試験>

(試験例7)

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22.4mgに局方生理食塩液(株式会社大塚製薬工場製)15mLを加え、スターラーで攪拌しつつ溶解させた後、0.22 μ mのフィルターでろ過後、滅菌し、2.0mg/mL(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]換算濃度)の投与液を得た。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。得られた投与液のpHは、3.969であった。

[0102] カニクイザルを購入後(日本チャールス・リバー株式会社より購入、支輸出国:中国)、サルの検査場所指定施設で、30日間以上の輸入検疫期間を含めて検疫・馴化を6週間以上行い、健康状態が良好であることを確認した動物を本試験へ移管した。

動物移管後、一般状態及び摂餌量を6日間観察して健康状態が良好であることを確認したのち、投与に供した。カニクイザルの投与時の体重は、3.60~4.34kgであった。

尚、飼育環境としては、温度23.0~29.0°C、相対湿度35.0~75.0%、12時間周期の照明(7:00~19:00)の条件下で、固形飼料(CMK-2:日本クレア社製)及び飲用水(5 μ mフィルター濾過後、紫外線照射した水道水)を自由に摂取させた。

[0103] 急速静脈内投与は、上記投与液を、上記で得られたカニクイザル(投与時の年齢:4年齢)に、翼付注射針(25G \times 3/4"、ニプロ社製)及びディスプレイシリンジ(2.5mL、テルモ社製)を用いて2mL/minの投与速度で伏在静

脈内に投与（単回投与）することにより行った。尚、投与液量は、投与日に測定した体重に基づき算出し、1mg/kgであった。

[0104] 上記した急速静脈内投与の投与終了時点から5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、10時間、24時間、48時間、72時間、120時間及び168時間後に、非麻酔下で橈側皮静脈あるいは大腿静脈から約0.50mL（投与後120時間までの場合）又は約5mL（投与後168時間）を採血した。採血した各サンプルについて、血液中放射能濃度及び血漿中放射能濃度、並びに薬物動態パラメータを求めた。その結果を、表8及び図10に示す。

また、試験例6と同様にして、急速静脈内投与後1時間、4時間及び24時間における放射能の血球移行率(T)及び血漿中放射能濃度に対する血液中放射能濃度の比(R_b 値)を表9に示す。

[0105] [表8]

表8. カニクイザルへのマレイン酸塩の単回急速静脈内投与後の血液及び血漿中の放射能濃度及び薬物動態パラメータ

投与時間/ 薬物動態パラメータ		放射能濃度 (ng eq./mL)	
		血液中濃度	血漿中濃度
5分		632.2	320.0
15分		300.1	167.9
30分		217.7	134.4
1時間		190.3	113.4
2時間		143.8	99.3
4時間		122.2	77.3
8時間		107.2	68.7
10時間		96.9	58.9
24時間		61.4	52.8
48時間		56.5	48.4
72時間		47.5	48.3
120時間		43.3	36.6
168時間		36.9	34.9
C_0 (ng eq./mL)	時間0に外挿した初期血液中 又は血漿中放射能濃度	915.5	440.9
$t_{1/2}$ (h)	消失半減期	199.6	223.3
AUC_{0-t} (ng eq.·h/mL)	血液又は血漿中 放射能濃度 一時間曲線下面積	9280	7785
AUC_{0-inf} (ng eq.·h/mL)	血液又は血漿中 放射能濃度 一時間曲線下面積	19908	19030
CL_{total} (mL/h/kg)	全身クリアランス	50	53
Vd_{ss} (mL/kg)	定常状態の分布容積	13811	16780
MRT_{0-inf} (h)	平均滞留時間	274.9	319.3

[0106] [表9]

表9. カニクイザルへのマレイン酸塩単回急速静脈内投与から1、4及び24時間後の血漿中における、血球移行率及び血液中放射濃度の比率

時間	ヘマトクリット値(Ht) (%)	放射能濃度 (ng eq./mL)		血球 移行率(T) (%)	血液中 放射能濃度 /血漿中 放射能濃度 (R _b)
		血液中放射能 濃度(C _b)	血漿中放射能 濃度(C _p)		
1時間後	44.0	170.9	101.5	66.7	1.68
4時間後	40.0	126.0	63.4	69.8	1.99
24時間後	36.0	62.9	46.6	52.6	1.35

[0107] 表8及び9並びに図10の結果から、カニクイザルへの急速静脈内投与において、血液中放射能濃度は投与5分後から投与24時間後までは比較的速やかに低下し、それ以降の消失は緩徐であった。また、血漿中放射能濃度は、血液中放射能濃度と比較して同程度又は低い値で推移し、本発明のマレイン酸塩は血球成分に移行し易いことが確認された。

これらの結果から、本発明のマレイン酸塩は、注射による静脈内投与に適していることがわかった。

[0108] (試験例8)

(組織中放射能濃度の測定)

上記した試験例7における各時間の採血終了後のカニクイザルに、ペントバルビタール(ソムノペンチル、共立製薬社製)を約0.4mL/kgの用量で静脈内投与し、全身麻酔下、頸動脈より放血し、安楽死させたのち下記表10の組織を摘出した。尚、表10において、組織A~Cの分類は、上記した表5におけるものと同一である。

[0109]

[表10]

表10. 採取試料

—	血液	A	眼球	A	脾臓
—	血漿	A	顎下腺	A	精巣
A	皮膚	C	腸間膜リンパ	C	動脈(腹大動脈)
A	線条体	A	甲状腺	C	皮膚(下腹部、毛を刈った)
A	海馬	A	胸腺	C	骨格筋(大腿筋)
A	視床下部	A	心臓	C	骨髄(大腿骨)
A	小脳	A	肺	C	白色脂肪(精巣周辺)
A	延髄	A	肝臓	C	褐色脂肪(腋窩部)
C	脊髄	A	副腎	A	胆嚢
—	脳脊髄液	A	腎臓	A	胆汁(胆嚢内)
A	胃 ^{*1}	A	脾臓	B	下垂体
A	胃内容物 ^{*1}	A	小腸 ^{*1}	A	大腸 ^{*1} (盲腸を含む)
A	小腸内容物 ^{*1}	A	大腸内容物 ^{*1} (盲腸内長物を含む)		

*1: 投与後168時間のみを採取したもの

[0110] 血液及び血漿の放射能測定用試料の採取は、試験例7と同様に行った。

脳脊髄液は、マイジエクター(27G×1/2"、1mL、テルモ社製)を用いて採取し、試験例6と同様の方法で放射能を測定し、脳脊髄液中放射能濃度を求めた。

表10に記載の他の組織については、生理食塩水で洗浄し、濾紙片により付着水分を除いた。

尚、消化管は切開し、約40mLの生理食塩水で内容物を洗い出す操作を2回繰り返した後、濾紙片により付着水分を除き、内容物を洗い出した生理食塩水は2回分を合わせた。

また、胆汁は胆嚢から注射針(テルモ社製)を装着した注射筒(テルモ社製)を用いて採取した。

採取した試料について、試験例6と同様の方法で放射能を測定し、組織(胆嚢中胆汁及び消化管内容物は除く)については組織中放射能濃度を求めた。また、血漿中放射能濃度に対する各組織中放射能濃度の比率(T/P比)についても算出した。尚、T/P比の算出にはMicrosoft Excel 2010を用いた。

全重量が測定可能な組織(組織A及びB)については、測定した組織全重量に基づき投与放射能に対する分布率(組織中放射能分布率)を算出した。

血液、骨格筋、皮膚及び白色脂肪については、組織全重量をそれぞれ体重の6.0%、41.4%、9.4%及び7.8%として組織中放射能分布率を算出した。

[0111] また、採取した組織について、上記A～Cに分類した組織は、それぞれ、以下のように処理した。

・組織A：組織重量を測定し、組織は解剖用剪刀により、消化管内容物（胃内容物、小腸内容物、大腸内容物）はミキサーにより、それぞれ粗砕した後、一部をコンバストパッドに分取、秤量して(n=1)、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

・組織B：コンバストパッドに採取して組織重量を測定した後、全量をサンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

・組織C：組織の一部を採取し、約0.1g(n=1)をコンバストパッドに分取、秤量して、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

また、脳脊髄液については、マイジェクター（テルモ社製）を用いて一部(n=1)をコンバストパッドに分取、秤量して、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

[0112] 上記のようにして求めた、カニクイザルに実施例1のマレイン酸塩を1mg/kgの用量で単回急速静脈内投与したときの組織中放射濃度及び組織中放射能分布率を、それぞれ表11及び表12に示す。

[0113]

[表11]

表11. カニクイザルへのマレイン酸塩単回急速静脈内投与から1、24及び168時間後の組織中放射能濃度

組織	放射能濃度 (ng eq./mL) (各組織中の放射能濃度/血漿中の放射能濃度の比(T/P比))		
	1時間後	24時間後	168時間後
血液	168.3 (1.87)	62.9 (1.35)	36.9 (1.06)
血漿	90.2 (1.00)	46.6 (1.00)	34.9 (1.00)
大脳皮質	76.0 (0.84)	75.2 (1.61)	166.0 (4.76)
線条体	50.2 (0.56)	73.0 (1.57)	116.2 (3.33)
海馬	72.1 (0.80)	68.4 (1.47)	193.1 (5.53)
視床下部	303.6 (3.37)	119.9 (2.57)	246.8 (7.07)
小脳	87.1 (0.97)	73.8 (1.58)	187.2 (5.36)
延髄	56.3 (0.62)	64.7 (1.39)	154.3 (4.42)
脊髄	25.1 (0.28)	34.7 (0.74)	87.1 (2.50)
下垂体	2924.5 (32.42)	4161.5 (89.30)	5785.9 (165.79)
眼球	80.6 (0.89)	283.8 (6.09)	370.0 (10.60)
顎下腺	2096.2 (23.24)	2360.5 (50.65)	3832.9 (109.83)
腸間膜リンパ	1526.5 (16.92)	2270.0 (48.71)	4501.3 (128.98)
甲状腺	4815.7 (53.39)	2417.3 (51.87)	851.4 (24.40)
胸腺	991.7 (10.99)	7492.9 (160.79)	2584.5 (74.05)
心臓	7868.9 (87.24)	4835.8 (103.77)	1735.5 (49.73)
肺	16588.7 (183.91)	12499.3 (268.23)	12687.8 (363.55)
肝臓	7905.0 (87.64)	541.02 (116.10)	3961.6 (113.51)
副腎	7381.2 (81.83)	10530.4 (225.97)	14988.5 (429.47)
腎臓	10277.2 (113.94)	5524.9 (118.56)	3965.6 (113.63)
脾臓	7165.9 (79.44)	10878.9 (233.45)	14009.9 (401.43)
膵臓	4581.9 (50.80)	4677.2 (100.37)	7198.1 (206.25)
精巣	331.0 (3.67)	244.2 (5.24)	775.9 (22.23)
動脈	345.8 (3.83)	232.8 (5.00)	333.5 (9.56)
皮膚	239.4 (2.65)	21.86 (4.69)	327.6 (9.39)
骨格筋	1517.4 (16.82)	1483.2 (31.83)	521.8 (14.95)
骨髄	223.8 (2.48)	771.8 (16.56)	863.1 (24.73)
白色脂肪	804.5 (8.92)	220.4 (4.73)	387.6 (11.11)
褐色脂肪	7547.1 (83.67)	9652.2 (207.13)	9032.1 (258.80)
胆嚢	1271.6 (14.10)	1795.1 (38.52)	1112.6 (31.88)
胆汁	3488.0 (38.67)	14772.6 (317.0)	6306.0 (180.69)
脳脊髄液	2.2 (0.02)	ND (NC)	ND (NC)
胃	-- (--)	-- (--)	1190.1 (34.10)
小腸	-- (--)	-- (--)	2740.2 (78.52)
大腸	-- (--)	-- (--)	1167.0 (33.44)

ND:未検出 (Not detected)

NC:未計算 (Not calculated)

--:未決定

[0114]

[表12]

表12. カニクイザルへのマレイン酸塩単回急速静脈内投与から1、24及び168時間後の組織中放射能分布率

組織	放射能分布率(放射線全量に対する割合)(%)		
	1時間後	24時間後	168時間後
血液	0.98	0.38	0.23
大脳皮質	0.11	0.09	0.21
線条体	0.00	0.01	0.01
海馬	0.00	0.00	0.00
視床下部	0.02	0.01	0.02
小脳	0.01	0.01	0.03
延髄	0.00	0.01	0.01
下垂体	0.01	0.01	0.01
眼球	0.01	0.06	0.05
顎下腺	0.15	0.17	0.21
甲状腺	0.03	0.03	0.01
胸腺	0.03	0.12	0.11
心臓	2.32	1.45	0.60
肺	8.08	5.35	4.43
肝臓	13.35	9.93	5.48
副腎	0.11	0.20	0.20
腎臓	3.59	2.29	1.11
脾臓	0.80	0.79	0.98
膵臓	0.69	0.92	1.06
精巣	0.09	0.14	0.21
皮膚	2.18	2.07	3.15
骨格筋	60.89	61.98	22.10
白色脂肪	6.08	1.74	3.09
胆嚢	0.01	0.01	0.01
胆汁	0.27	0.68	0.28
胃	--	--	0.65
小腸	--	--	3.31
大腸	--	--	1.25
胃内容物	--	--	0.03
小腸内容物	--	--	0.37
大腸内容物	--	--	2.01
合計	99.81	88.45	51.22

--:未決定

[0115] 表11及び12の結果から、組織中放射能濃度は、大部分の組織において血漿よりも高く、本発明のマレイン酸塩は組織移行性が高いことが示唆された。

また、副腎、脾臓、膵臓、脳下垂体等多くの組織において投与後168時間に最高濃度を示し、体内残存量（組織中放射能分布率の合計）は投与放射能の51.22%であったことから、本発明のマレイン酸塩は、組織残留性が高く、体外への排出は非常に援除であると考えられる。

[0116] <水溶液中安定性試験>

(試験例9)

逆浸透膜 (RO) 水製造装置 (MILLIPORE社製 Elix)、フィルター (MILLIPORE社製 PROGARD S2 CARTRIDGE) を用いて、逆浸透膜 (RO) 水を作製した。

トリフルオロ酢酸 (TFA) (和光純薬工業社製 和光特級) 2 mL を前記逆浸透膜 (RO) 水 2000 mL に溶解し、0.2% TFA 水溶液を調整した。アセトニトリル (和光純薬工業社製 HPLC用アセトニトリル) 1 容量と 0.2% TFA 水溶液 1 容量を振り混ぜ試料溶解液を調製した。実施例 1 で得られたマレイン酸塩 5.0 mg を計量し、調整した試料溶解液に溶かして 20 mL にし (25% W/V)、30 mL 容量のバイアル管中で室温 (20°C) と冷蔵庫内 (4°C) の 2 通りの温度条件にて保管した。経時的なマレイン酸塩の純度の測定は、試料 5 μ L を採取し、以下の条件で液体クロマトグラフィーを行い、マレイン酸塩のピーク面積を測定した。

<測定条件>

HPLC装置: prominence (島津製作所製)

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長 245 nm)

カラム: オクタデシルシリル化シリカゲル充填カラム (GL Sciences Inc社製 Inertsil ODS-2)

カラム温度: 40度付近の一定温度

移動相条件: アセトニトリル/0.2% TFA 水溶液を 20/80 から開始し、20分間の直線グラジエント法で 60/40 にし、その後、30分間この条件を保つ。

流量: 1.0 mL/min

試料溶液注入量: 5 μ L

以上の条件下で、マレイン酸塩は 15分付近に検出される。

マレイン酸塩の純度は、(マレイン酸塩のピーク面積) / (保持時間 4 ~ 35分のピーク面積合計) \times 100 によって求めた。その結果を表 13 に示す

表13の結果から、本発明のマレイン酸塩は、水溶液中で室温および冷蔵庫内で30日経過後も97%以上の保存率を示し、水溶液中でも安定であることが明らかとなった。

[0117] [表13]

表13. 水溶液中の保存安定性

保存条件	経過日数(日)	純度(%)
室温 (20℃)	0	98.77
	8	97.22
	17	98.16
	22	98.08
	31	98.19
冷蔵庫 (4℃)	0	98.77
	9	98.95
	18	99.23
	25	98.25
	32	97.88

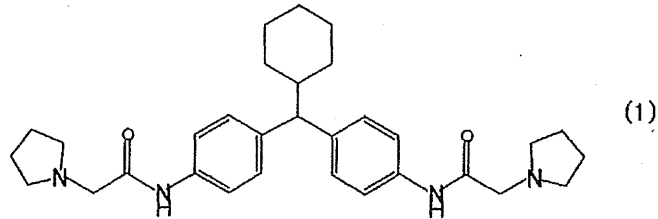
産業上の利用可能性

[0118] 本発明のマレイン酸塩は、プリオン病の予防、改善又は治療剤の有効成分として使用することができる。また、本発明のマレイン酸塩は、結晶性及び結晶の安定性に優れたものであり、大量合成ができるため、該マレイン酸塩を含むプリオン病の予防、改善又は治療剤の製造を実用化することができる。さらに、本発明のマレイン酸塩は、水溶化できるため、注射剤として使用することができる。

請求の範囲

[請求項1] 下記式(1)で表される化合物のマレイン酸塩。

[化1]



[請求項2] 請求項1に記載のマレイン酸塩を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

[請求項3] プリオン病の予防、改善又は治療剤であることを特徴とする請求項2に記載の医薬組成物。

[請求項4] 請求項1に記載のマレイン酸塩を水に濃度25%W/Vで溶解させ、30日経過後に、前記マレイン酸塩が97%以上の保存率を示すことを特徴とする請求項2又は3に記載の医薬組成物。

[請求項5] 請求項1に記載の式(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請求項1に記載のマレイン酸塩の製造方法。

[請求項6] 脳に到達する製剤である請求項2～4のいずれか1項に記載の医薬組成物。

要約書

本発明は、結晶性及び結晶の安定性が高い抗プリオン化合物を提供すること、及びプリオン病の予防、改善又は治療剤を提供することを課題とする。

本発明は、下記式(1)で表される化合物のマレイン酸塩である。

【化1】

