

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 ($^\circ$))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50 mg/mL、pH 3.79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3～4 Kg)を用い、ディスポータ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5 mL/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0.5 mL/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 \times g、3分、約4 $^\circ$ C)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BLQ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】

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Fukuo-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穴プレートに播種し、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、150 μ Lのトリトン-DOC溶解液で溶解した。11200 \times 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1 mg/mLに調整して試料を得た。

得られた試料を、20 μ g/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 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、180V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PVDF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 μ 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 μ 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。

【産業上の利用可能性】

【0084】

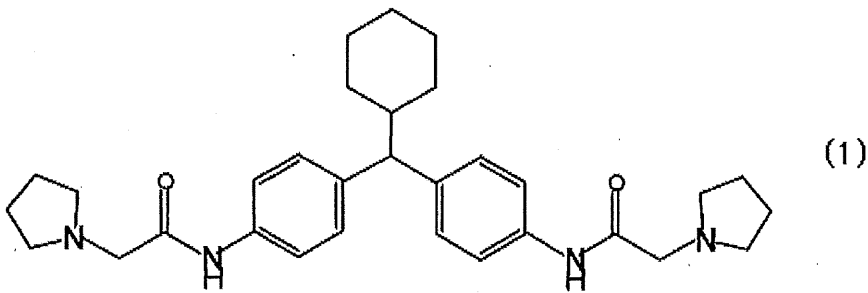
本発明のマレイン酸塩は、プリオン病の予防、改善又は治療剤の有効成分として使用することができる。また、本発明のマレイン酸塩は、結晶性及び結晶の安定性に優れたものであり、大量合成ができるため、該マレイン酸塩を含むプリオン病の予防、改善又は治療剤の製造を実用化することができる。さらに、本発明のマレイン酸塩は、水溶化できるため、注射剤として使用することができる。

【書類名】 特許請求の範囲

【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。

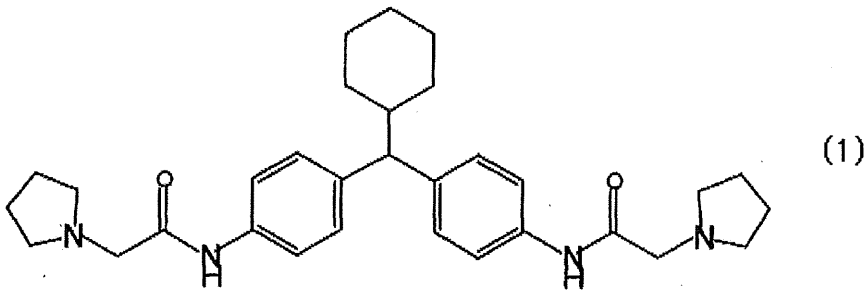
【書類名】要約書

【要約】

【課題】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。

【解決手段】下記式(1)で表される化合物のマレイン酸塩。

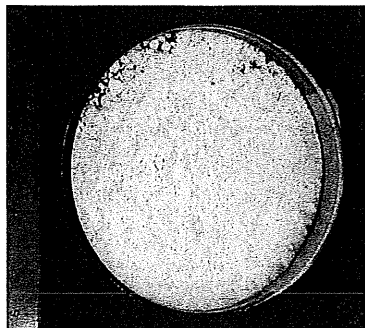
【化1】



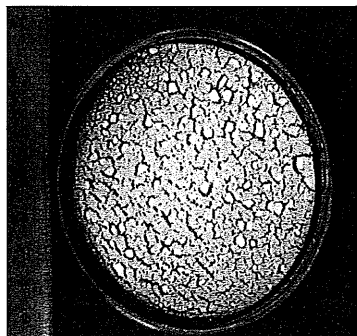
【選択図】なし

【書類名】 図面

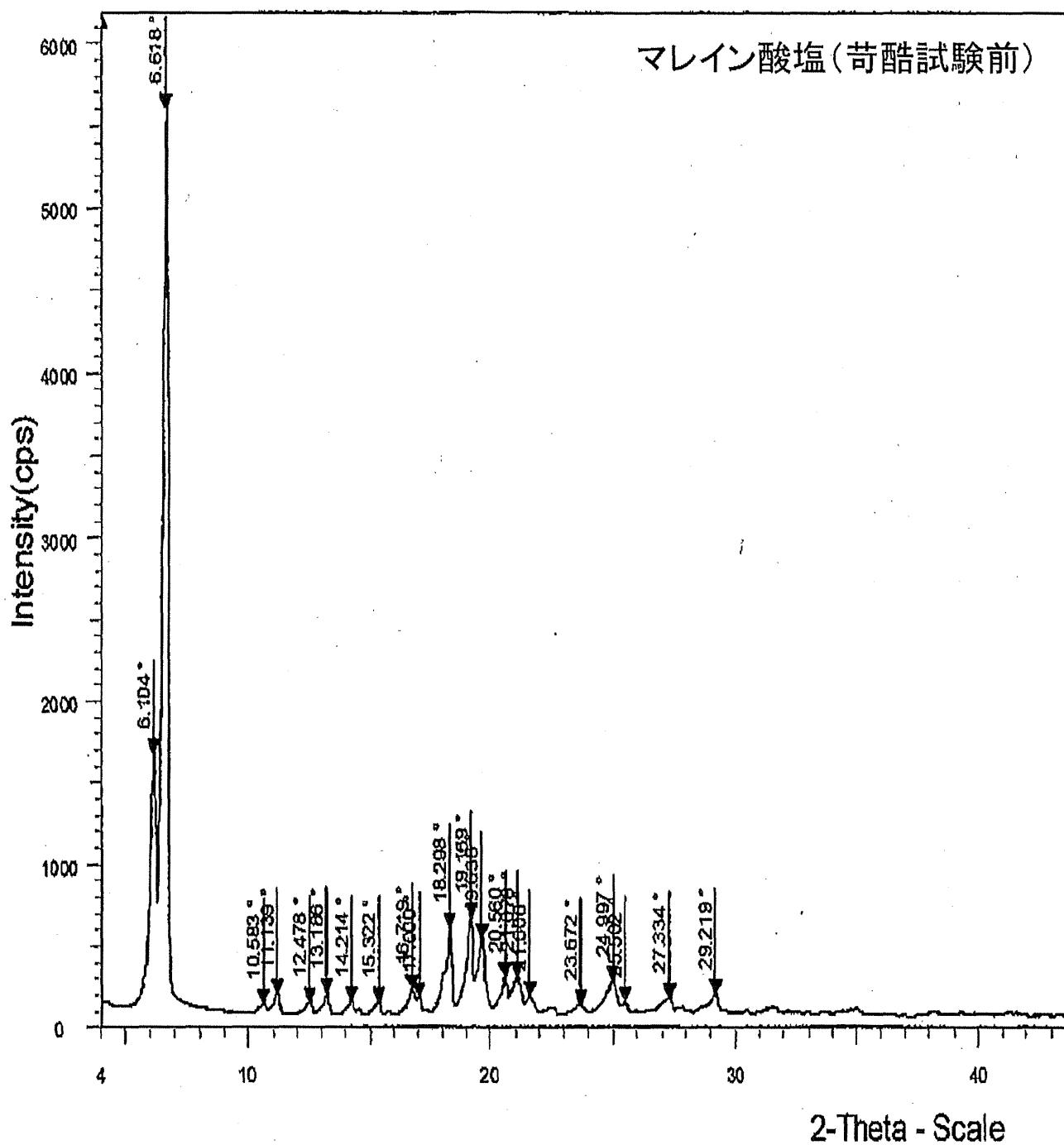
【図 1】



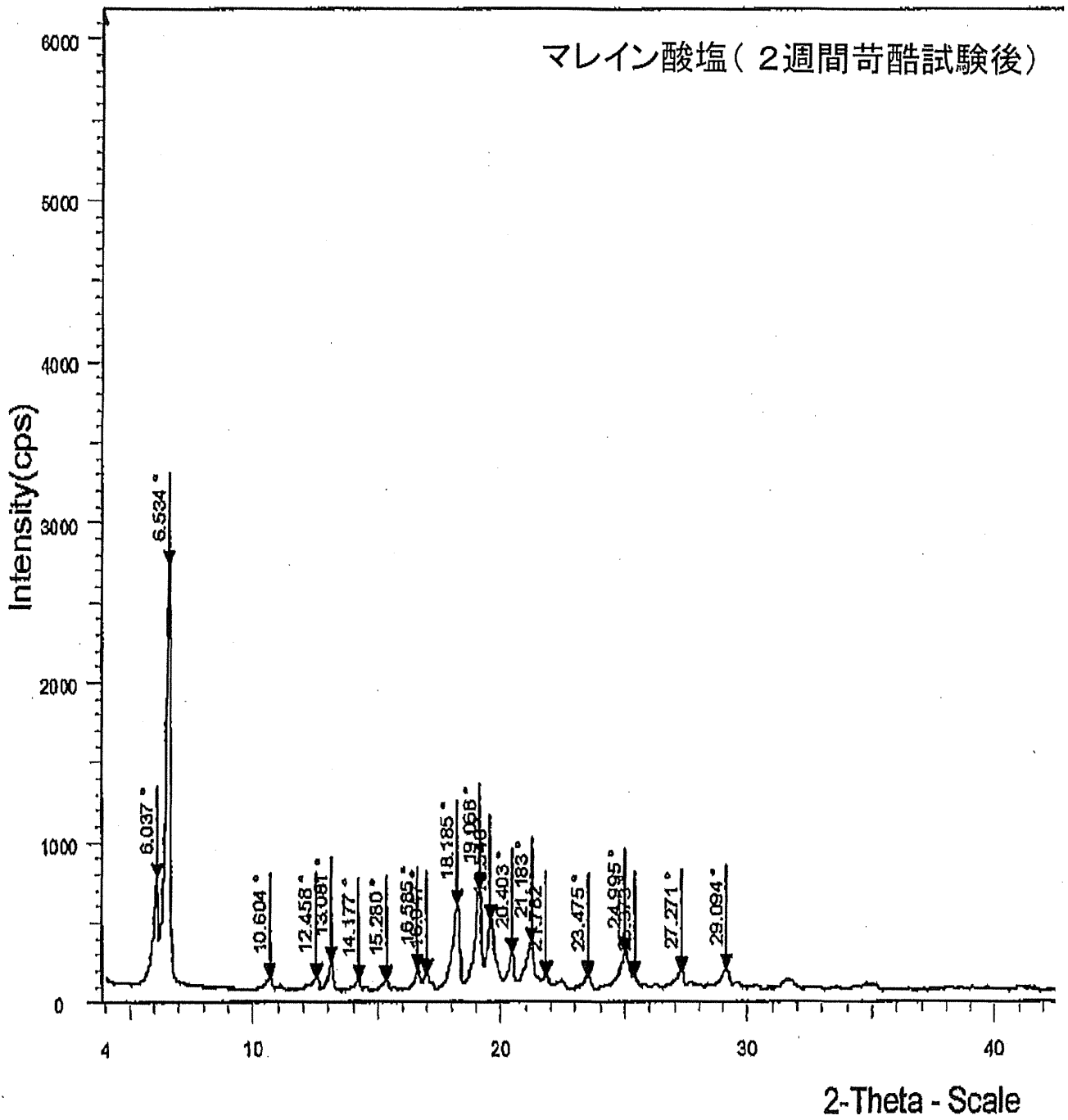
【図 2】



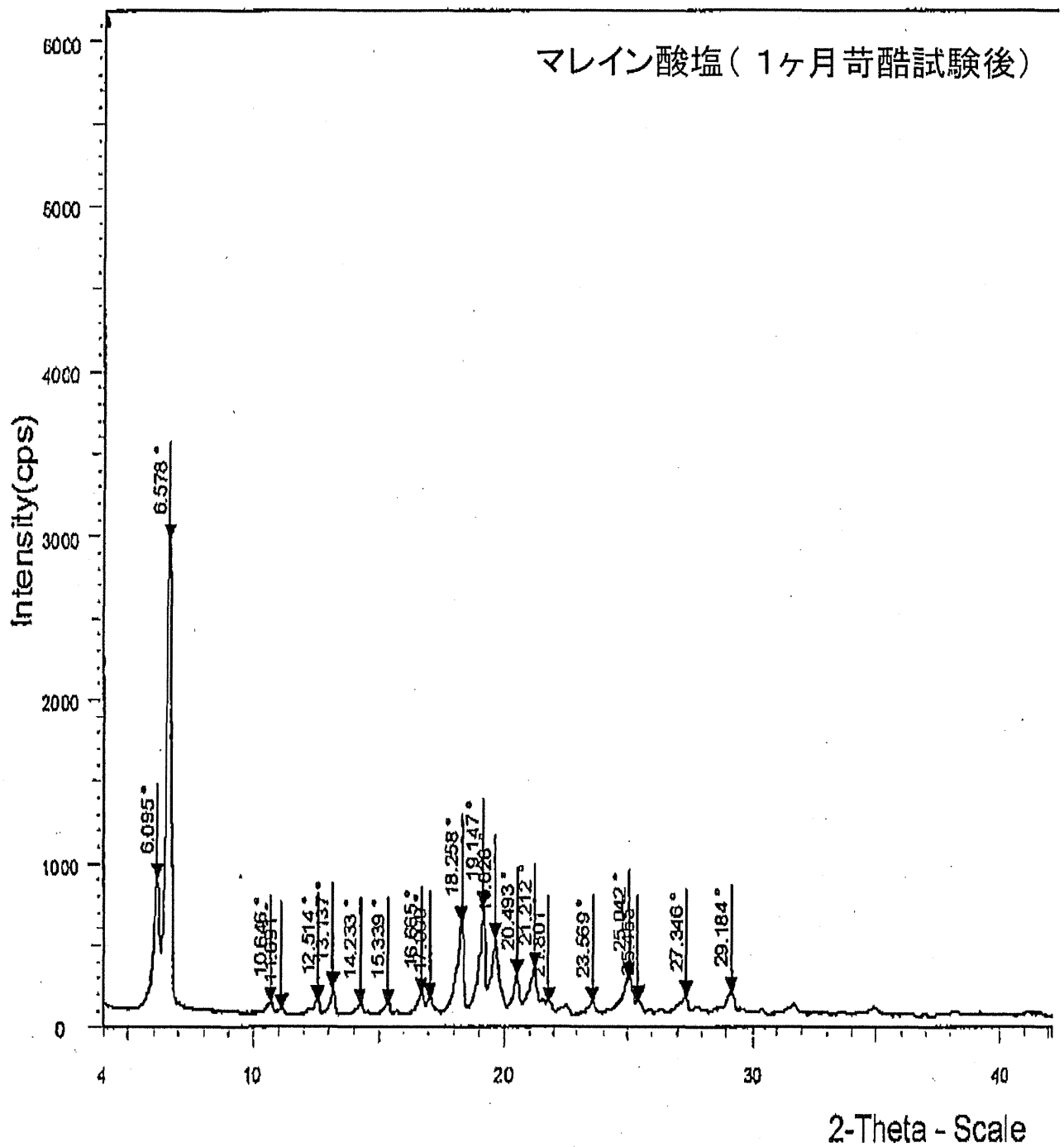
【図 3】



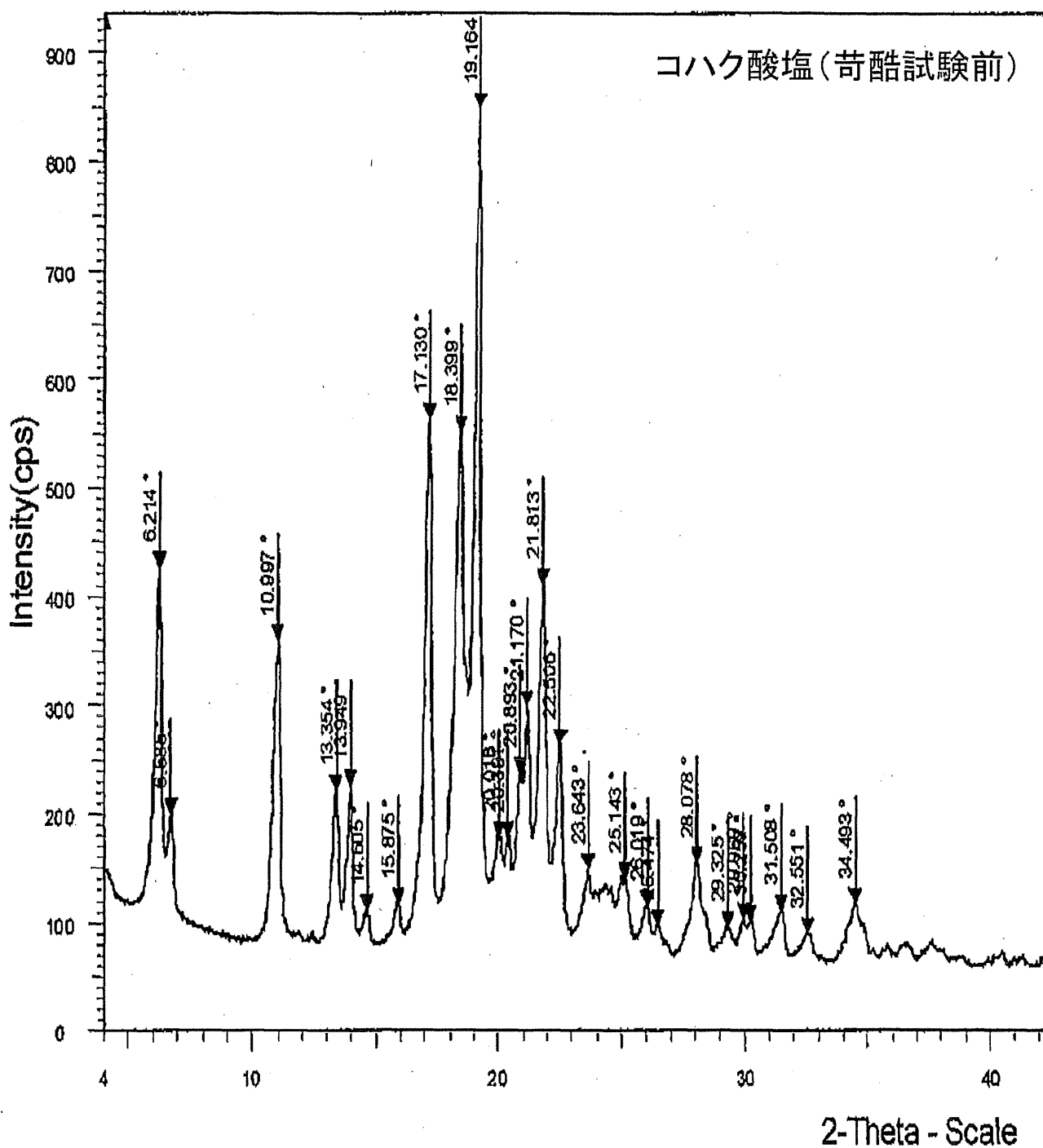
【図 4】



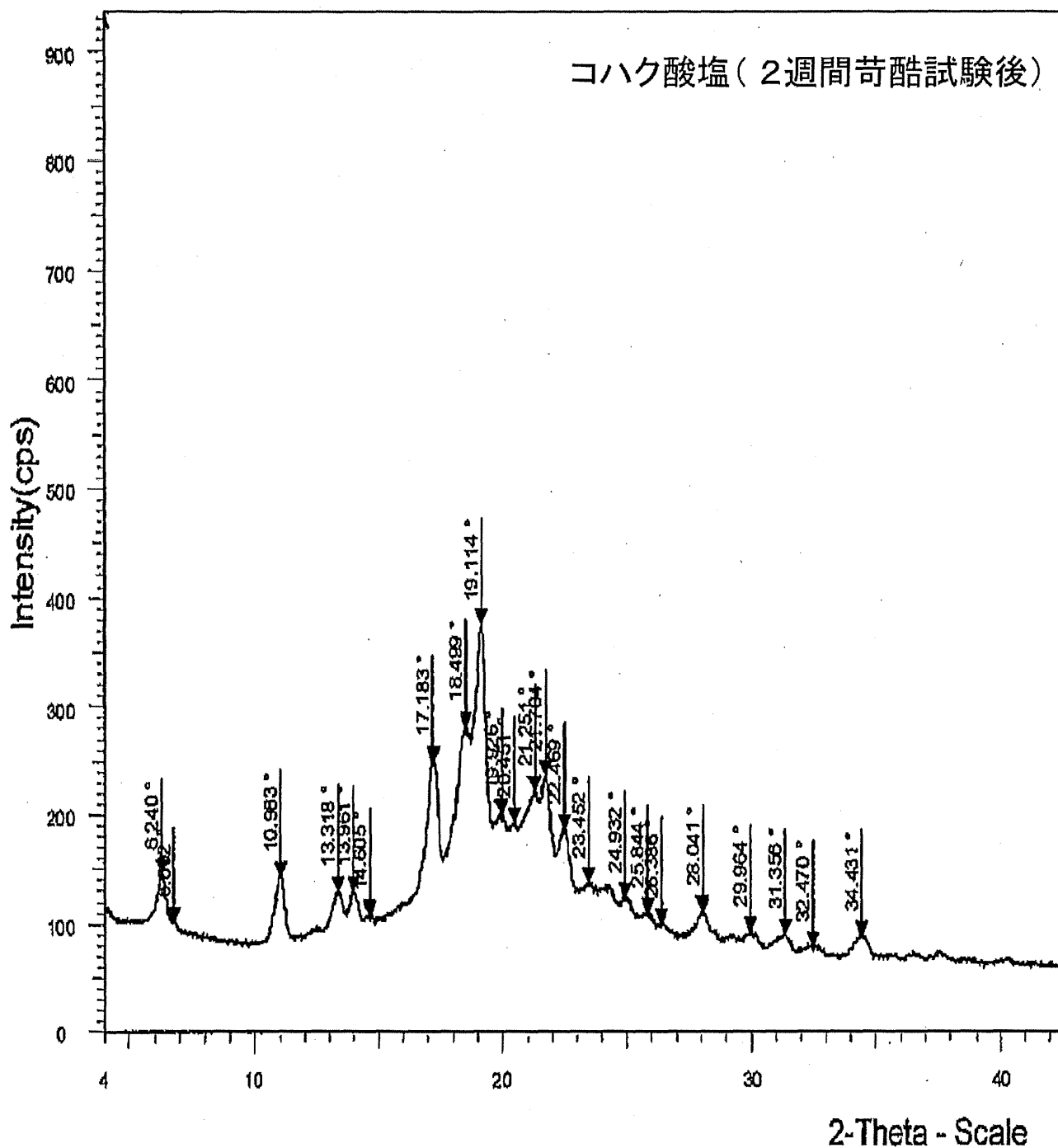
【図 5】



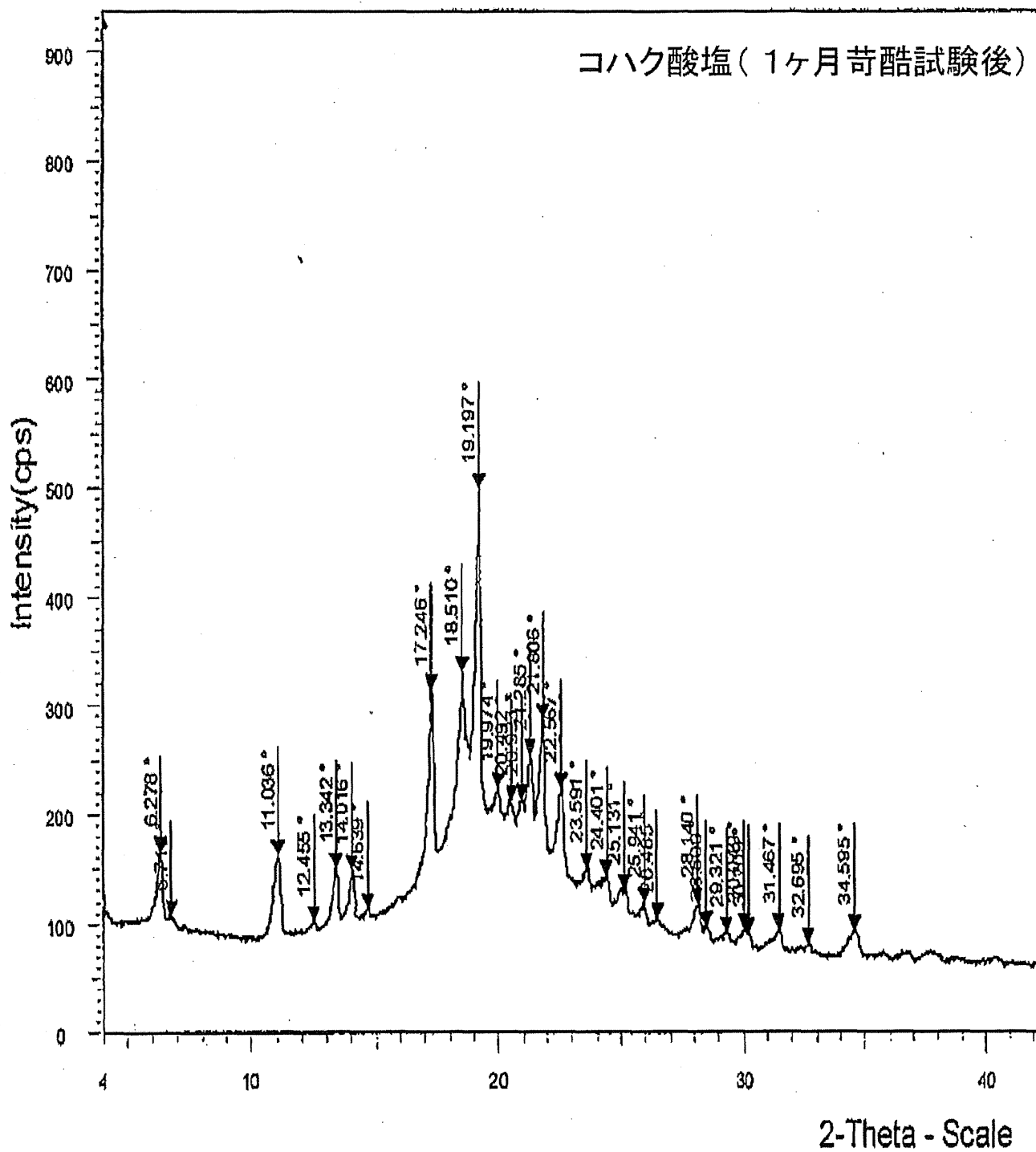
【図 6】



【図 7】



【 図 8 】



H20-64

平成26年11月25日

国立大学法人岐阜大学
学術情報部 産学連携課 御中

〒451-6009 名古屋市西区牛島町6番1号
名古屋ルーセントタワー9階
TEL 052-588-3361 ・ FAX 052-551-2033
特許業務法人 快友国際特許事務所
弁理士 中村 敦子

特許査定のご案内

拝啓 時下益々ご清栄のこととお喜び申し上げます。

さて、このたび下記の特許出願に対し特許庁より特許査定の際本を受け取りました。その特許査定の際本及び弊所の成功報酬の請求書をお送りしますので、ご査収下さいますようお願い申し上げます。今回の特許する旨の査定によって登録料を納付されますと、登録原簿に登録されて特許権が成立します。

なお、登録料の納付の有無にかかわらず、手続きの都合上、2014年12月18日迄に下記連絡表を必ずFAX下さいますようお願い申し上げます。

なお、本件に関しましては、2007年4月1日以降の出願であり、登録査定の際本送達日2014年11月25日から30日以内に分割出願が可能です。分割出願を希望される場合は、登録料の納付の有無と併せてその旨ご連絡下さい。

敬具

記

1. 事件名:

- (1) 貴社整理番号 G I - H 20 - 64
- (2) 弊所整理番号 K09-053-JP2
- (3) 出願番号 特願2011-513378
- (4) 名称 プリオンタンパク質構造変換抑制剤及びその利用
- (5) 登録料納付期限 2014/12/25
- (6) 請求項の数 13

特許登録料は納付期限前に最低3年分を納付しなければなりません。期限前であれば4年目以降分をまとめて納付することができます。特許登録と維持年金の額は別紙の料金表を参照下さい。

一回の納付手続に対して当所の手数料として10,000円(税別)を請求させていただきます。

4年目以降分をまとめて納付されますと当所の納付手数料を節約することができますが、将来的に権利が不要となったときに、既に納付してしまった維持年金が無駄となります。

下記記入欄に必要事項を記入し、切り取らないでそのままFAXして下さい。

特許業務法人 快友国際特許事務所行 FAX 052-551-2033

●登録料については、いずれかに丸をつけてください。

登録料を納付する。	1～3年分のみ支払う。	↓
	1～()年分をまとめて納付する。	
登録料を納付しない。		

●分割出願については、いずれかに丸をつけてください。

分割出願をする。	↓
分割出願はしない。	

御担当者 _____

TEL _____

FAX _____

特許査定

特許出願の番号 特願2011-513378
起案日 平成26年11月17日
特許庁審査官 早乙女 智美 3759 4P00
発明の名称 プリオンタンパク質構造変換抑制剤及びその利用
請求項の数 13
特許出願人 国立大学法人岐阜大学
代理人 特許業務法人快友国際特許事務所

この出願については、拒絶の理由を発見しないから、特許査定をします。

上記はファイルに記録されている事項と相違ないことを認証する。

認証日 平成26年11月20日 経済産業事務官 高地 伸幸

注意: この書面を受け取った日から30日以内に特許料の納付が必要
です。

知的財産審査委員会
 審議結果報告

< 1. 発明情報 >

案件名: 抗プリオン化合物のマレイン酸塩及びその製造方法、並びにその医薬組成物
 代表発明者: 桑田 一夫
 整理番号: S2014-0381
 出願番号: 2014-023838 2014/02/10 出願

< 2. 支援の申請項目と審議結果 >

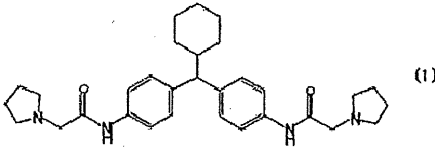
本件について以下の通り、
 支援の対象とする 支援の対象としない

(詳細)

区分	国または出願	備考
特許協力条約に基づく国際出願	OPCT 出願	

○ : 支援する × : 支援しない 【追加】 : 委員会による追加支援

< 3. 所見 >

【発明の概要】	<p>本発明は、下記式(1)で表される抗プリオン化合物のマレイン酸塩及びその製造方法、並びにそれを含むプリオン病の予防、改善又治療薬に関するものである。</p>  <p>本発明により、結晶性及び結晶の安定性に優れた抗プリオン化合物を製造できる。また、化合物(1)に比べて水溶性に優れるため、注射剤としての使用を可能とした。</p>
【特許性】注1	<p>次の理由により、主要請求項で特許化の可能性が期待できる。</p> <p>特許文献(WO2010/131717)に、本発明と同じ化合物(1)の記載があるが、マレイン酸塩については記載がない。特許文献(特開 2011-63574)に、本発明と類似した構造を有する化合物のマレイン酸塩の記載があり、化合物(1)のマレイン酸塩も同業者が容易に想到可能と判断される虞がある。また、特許文献(WO2012/073508 A1)に、マレイン酸塩にすることで、原薬安定性、溶解性及び結晶性を有することが示されており、本発明のマレイン酸塩も同様の物性が期待できることは容易に想到可能と判断される虞がある。しかし、本発明のマレイン酸塩が最良であることは予測できない、またマレイン酸塩にすることで静脈注射が可能となり、血中、血漿中の安定性が高い具体的データが示されている、等の主張により、特許化の可能性があるとと思われる。</p>
【有用性】	<p>次の理由により、有用性が期待できる。</p> <p>本発明マレイン酸塩化合物は、フリー体と同等の抗プリオン活性を有し、結晶性及び結晶安定性に優れ、工業的な大量合成が可能であること、フリー体に比べて水溶性に優れるため、静脈内投与が可能となり、血中、血漿中の安定性に優れること、が示された。また、産官学による医師主導治験体制の下、ロードマップに基づき実用化に向けて進められており、有用性が期待できる。</p>
【条件】注2	<p>安全性および薬理動態を確認すること。</p>

【要望その他】	開発計画に沿って適切に研究を進めてほしい。
---------	-----------------------

注1：所見の【特許性】は、支援可否判断に用いるために JST が独自調査した結果によるものです。
外国出願後は各国知財当局により別途審査されます。

注2：【条件】を満足しないと、原則、移行審査時に不採択となります。

特許文献1の化合物（フリー体）は結晶安定性が悪いこと及び臨床的に経口投与に限定される。本願の化合物（塩）は14種の酸と8種の溶媒との組み合わせから鋭意検討を重ね、結晶安定性のよいもの、マレイン酸塩、コハク酸塩、酢酸塩の3種が残った。酢酸塩は乾固すると酢酸が抜けた。残りの2種を温度40℃、湿度75%、2週間の過酷試験を行い、コハク酸塩は吸湿し、1ヶ月後でも安定な結晶性を保つマレイン酸塩が最終的に最良であることを導き出した。1ヶ月後のX線解析データでも結晶性を保つことを示した。マレイン酸にすることで水溶化でき、注射剤とすることが可能になった。プリオン病患者は自ら嚥下できないので経口投与は困難である。

特許文献1と特許文献2の組み合わせにより、本願の化合物、すなわちマレイン酸塩が当業者により、容易に予測でき得ると、特許庁審査官より指摘が出るのが想定されるが、

1. 本願は先願2件と構造的に非類似である。
2. 特許文献2の請求項1に「薬学上許容される塩」の記述と、【0016】にマレイン酸の記述があるが、マレイン酸が最良であるとの記述はない。

以上のように、新規性、進歩性を有すると、特許事務所は判断しています。

塩基性化合物を酸に接触させ塩にすることは薬学上常道です。シンプルな塩酸であったり、酢酸、乳酸、酒石酸など様々な有機酸をみかけます。サリチル酸、ベンゼンスルホン酸など芳香族の酸はあまり見かけませんが……。上述のように薬学上繁用される無機、有機、芳香族の酸14種と8種の溶媒との組み合わせから導出したものなので、特許文献3のコメントは当てはまらないと思います。マレイン酸が最良であるとは予測できないと思われれます。

明細書に追加予定のデータ

- ・ 固体のマレイン酸塩の安定性（過酷試験）データはあるがさらにマレイン酸塩の水溶液（生理食塩水）中での長期安定性（+4℃、室温）データを加える。
- ・ くっ付いているマレイン酸のモル数（1モル or 2モル）を言及する。
- ・ 10/16、ヒアリング時のパワーポイント18,19,20,21ページのデータを加える。

以上が、特許事務所の弁理士との打ち合わせのまとめです。

備考：

岩谷国際特許事務所は元・武田薬品の知財部長が所長で、創薬の案件のみを扱い、査定率、拒絶査定不服審判の勝率が高い特許事務所です。本願は必ず権利化できると自信を持っています。

以上

受領書

平成27年 2月 3日
特許庁長官

識別番号 100077012
氏名(名称) 岩谷 龍 様

以下の書類を受領しました。

項番	書類名	整理番号	受付番号	提出日	出願番号通知(事件の表示)
1	国際出願	G13F5178	51500230931	平27. 2. 3	PCT/JP2015/ 52982 以上

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意 電子データが原本となります)

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式 PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、	
0-4-1	右記によって作成された。	JPO-PAS i222
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	G13F5178
I	発明の名称	抗プリオン化合物のマレイン酸塩及びその製造方法、並びにその医薬組成物
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	すべての指定国 (all designated States)
II-4ja	名称	国立大学法人岐阜大学
II-4en	Name:	GIFU UNIVERSITY
II-5ja	あて名	5011193 日本国 岐阜県岐阜市柳戸1番1
II-5en	Address:	1-1, Yanagido, Gifu-shi, Gifu 5011193 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	発明者である (inventor only)
III-1-4ja	氏名(姓名)	桑田 一夫
III-1-4en	Name (LAST, First):	KUWATA, Kazuo
III-1-5ja	あて名	5011193 日本国 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内
III-1-5en	Address:	c/o GIFU UNIVERSITY, 1-1, Yanagido, Gifu-shi, Gifu 5011193 Japan

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意 電子データが原本となります)

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	岩谷 龍
IV-1-1en	Name (LAST, First):	IWATANI, Ryo
IV-1-2ja	あて名	5300003 日本国 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル3階
IV-1-2en	Address:	KEIHAN Dojima Bldg. 3F, 1-31, Dojima 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 5300003 Japan
IV-1-3	電話番号	06-4796-1300
IV-1-4	ファクシミリ番号	06-4796-1301
IV-1-6	代理人登録番号	100077012
V	国の指定	
V-1	この願書を用いてされた国際出願は、規則4.9(a)に基づき、国際出願の時点で拘束される全てのPCT締約国を指定し、取得しうるあらゆる種類の保護を求め、及び該当する場合には広域と国内特許の両方を求める国際出願となる。	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	出願日	2014年 02月 10日 (10.02.2014)
VI-1-2	出願番号	2014-023838
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 国際事務局に対して、上記の先の出願のうち、右記のものについては、該当する場合には記載されたアクセスコードを利用し、優先権書類に記載されている事項に係る情報を電子図書館から、取得することを請求する。	VI-1 アクセスコード： DBC3
VI-3	引用による補充： 条約第11条(1)(iii)(d)若しくは(e)に規定する国際出願の要素の全部、又は規則20.5(a)に規定する明細書、請求の範囲若しくは図面の一部がこの国際出願には含まれていないが、受理官庁が条約第11条(1)(iii)に規定する要素の1つ以上を最初に受領した日において優先権を主張する先の出願にそれが完全に含まれている場合には、規則20.6に基づく確認の手続を条件として、その要素又は部分を規則20.6の規定によりこの国際出願に引用して補充することを請求する。	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)