

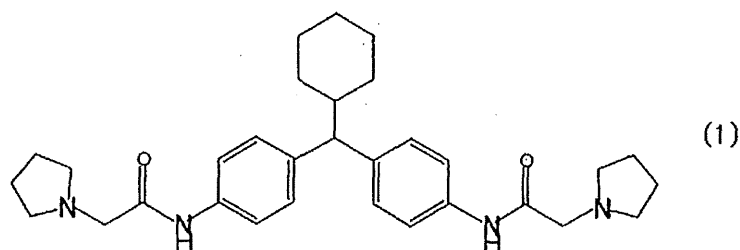
射線等で標識したタンパク質のイメージ解析手段（E L I S A、ECL-plusウエストンブロットティング等）等の認識されたタンパク質を定量化する手段とを組み合わせで行われる。

[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 I C 5 0（50%阻害濃度）に基づけば、I C 5 0は好ましくは1.0 μ M以下であり、より好ましくは0.5 μ M以下であり、さらに好ましくは0.4 μ M以下である。本発明において、I C 5 0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℃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℃)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℃)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>

$^1\text{H NMR}$ ($\text{dms}\text{-d}_6$, 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>

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 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]

[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. Milhavel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97, 13937-13942 (2000))マウス適合プリオンFukuoaka-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-DCC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 3mM の阻害剤（ペファブロック）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、富士フィルム社製）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 $\text{N,N}'\text{-}[(\text{シクロヘキシルメチレン})ジ-4,1\text{-フェニレン}]$ ビス[2-(1-ピロリジニル)アセトアミド]マレイン酸塩 29.9mg に局方生理食塩液（株式会社大塚製薬工場製） 100mL を加え、スターラーで攪拌しつつ溶解させ、 $\text{N,N}'\text{-}[(\text{シクロヘキシルメチレン})ジ-4,1\text{-フェニレン}]$ 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 60mL 採取し、局方生理食塩液 90mL を加えて希釈して、 $0.08 \text{mg}/\text{mL}$ （ $\text{N,N}'\text{-}[(\text{シクロヘキシルメチレン})ジ-4,1\text{-フェニレン}]$ 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CrI: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(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 \pm 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 \times 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（CF15D2、日立工機社製）を用いて遠心分離（4℃、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¹⁴CO₂をCO₂吸収剤(Carbo-Sorb、PerkinElmer社製:6mLとして設定)に回収させ、Permafluor Et(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
CL_{total} (mL/h/g)	全身クリアランス	128	145	---	1947	2845	---
CL_{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_2}/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
F_a (%)	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)

$F_a = (PO \text{ における } AUC_{0-inf}) / (Bolus \text{ における } AUC_{0-inf}) \times 100$

[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°C、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 _t)	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 $^{\circ}$ 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