

厚生省新薬開発研究事業

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬（E-64）の開発研究

昭和55年度研究報告書

班長 今堀和友

昭和56年3月

ま え が き

難病治療薬 E-64 の研究を開始して以来2年が経ったことになる。第2年度においては初年度の研究の線に沿って、これをさらに発展させることに努力したのであるが、さらに次のような新しい試みをも加えた。

まず第一は班員の増強である。すなわち、市原明、石浦章一、宮武正、寺尾寿夫の4氏を正式班員に加えたが、市原、石浦両氏は細胞内プロテアーゼに対する E-64 の効果の判定の幅を広げるため、宮武氏は細胞膜に対する E-64 の効果を調べるため、それぞれ参加して頂いた。他方、筋ジストロフィー動物として、チキンが妥当か否かについての疑問が生じてきたので、ヒトの生筋をヌードマウスに移植し、これについての E-64 の効果を判定してもらうため、寺尾氏に参加して頂いた。

第二の点は、E-64 関連化合物中より今年度からは E-64-c に的をしぼり、その大量生産の方法を確立することにより、試料供給を保証した。また E-64-c の連続投与を行ったチキンにつき、生理学、病理学、薬理学、生化学の各方面からその効果を総合的に判定するとともに、E-64-c の毒性についても徹底的に研究した。

昨年より引きつづき行われた研究については、本年度は大きな進展をみせたものが多く、その中には単に開発研究に止まらず、純学術的な立場からいっても世界の第一線級の成果が得られたものも多く含まれる。その点学術論文集としても充分価値あるものと信じている。

本研究は筋ジストロフィー治療薬の開発という視点から出発し、進みつつあるが、その成果の中には筋ジストロフィー症の研究者の参考となるものも含まれているであろう。他方、他の疾患中にも中性のチオールプロテアーゼが関与すると考えられるようになりつつあるものが増加しつつある今日、本成果はそれら疾患の研究に関係されている方々のお役にも立つのではないかと考えている。

最後に、本研究遂行に絶大な努力を払われ、かつ多忙中本報告書の執筆に労を惜しまれなかった班員の方々、本研究推進につき、すべての面で援助して頂いた厚生省薬務局の方々、さらに本報告書の出版をはじめ、班の運営につき事務のすべてを担当された大正製薬開発部の方々に深謝するものである。

今 堀 和 友

目 次

まえがき

I 製 造 方 法

1. E-64-c の製造 沢田 二郎 9
2. DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割法 沢田 二郎 11
3. E-64-c 標識体の製造 沢田 二郎 15
4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討 沢田 二郎 21

II 標的酵素に対する効果

5. ジストロフィーチキン骨格筋カテプシンB, H及びDの動態
ならびに E-64-c 投与による阻害について 勝沼 信彦 37
6. カルシウムプロテアーゼに対する E-64 の効果 今堀 和友 43
7. カルシウムプロテアーゼと磷脂質 西塚 泰美 49
8. プロテアーゼ阻害物質によるペプスタチン非感受性ヘモグロ
ビン水解酵素の誘導 市原 明 55
9. 筋ジストロフィーチキンの筋ガングリオシドに及ぼす E-64
の効果について (統報) 宮武 正 61

III 組織及び細胞中のタンパク代謝に及ぼす効果

10. ニューロフィラメント変性に対する E-64-c の効果 杉田 秀夫 67
11. E-64-c の骨格筋内分布と *in vivo* におけるプロテアーゼ阻
害作用についての検討 石浦 章一 71

12.	カルシウムによる骨格筋の崩壊に関する研究	石浦 章一	75
13.	培養筋細胞に対する E-64 の作用.....	小沢鉄二郎	85
	～筋管細胞のタンパク分解速度に及ぼす E-64-c の影響～		
14.	N-[N-(L-trans-3-Carboxyoxirane-2-carbonyl)L-leucyl] -3-methyl-butylamine (E-64-c) の筋蛋白質代謝に及ぼす 影響	江橋 節郎	89
15.	ヌードマウスへの異種移植筋の再生に対する E-64 の効果.....	寺尾 寿夫	93

IV 全身的影響に関する研究

16.	E-64-c の急性及び亜急性毒性に関する研究	大関 正弘	99
17.	E-64-c の抗原性に関する研究	大関 正弘	111
18.	E-64-c の感覚器に及ぼす影響	大関 正弘	115
19.	E-64-c の薬効に関する研究(1)	大関 正弘	123
	～筋ジストロフィーチキンに対する薬効試験～		
20.	E-64-c の薬効に関する研究(2)	大関 正弘	131
	～Serotonin myopathy に対する E-64-c の効果～		
21.	E-64-c の一般薬理作用	福原 武彦	141
	～特に呼吸・循環機能及び中枢神経に及ぼす影響～		
22.	取り込まれた E-64 の細胞内分布と運命について	勝沼 信彦	159
23.	E-64-c の生体内動態に関する研究.....	大関 正弘	163
24.	E-64-c の薬物代謝酵素活性への影響	北川 晴雄	179

I 製造方法

1. E-64-c の製造 沢田 二郎
2. DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割法 沢田 二郎
3. E-64-c 標識体の製造 沢田 二郎
4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討 沢田 二郎

1. E-64-c の製造

沢田二郎*

研究協力者 花田和紀* 玉井正晴* 安達孝*
小熊清司*

目 的 方 法

E-64-c, N-[N-(L-3-trans-Carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-3-methyl-butyl-amine, は合成的に得られた E-64 類縁体の一つであり, 筋肉の Ca^{++} -activated neutral protease (CANP)¹⁾ 及び ラット肝カテプシン B²⁾ 及び L 等のチオールプロテアーゼに対し, E-64 とほぼ同等の阻害活性を有することが既に明らかにされている。又, 大関ら^{3), 4)}は毒性, 或いは生体内動態に関する比較から, E-64-c が天然 E-64 に十分比肩しうることを報告している。

本研究の目的は筋ジストロフィー症に対する E-64-c の医薬品としての開発を最終目標として, その研究に携わる「E-64 研究班員」へのサンプルの供給, 並びに工場生産に必要な製造法の検討に関するものである。

E-64-c 合成法に関しては既に昭和54年度報告書⁵⁾中に詳細に報告した。ここではこの方法に準拠し, その製造規模をスケールアップすることに重点をおいた。尚, 出発原料として用いた L 及び D-トランスエポキシコハク酸モノエチルエステルはそれぞれ立体選択的に D 及び L-酒石酸より合成した⁶⁾。

結 果

最終的に 2.7kg の E-64-c を得, 本研究事業班員並びに研究協力者に提供した。又, E-64-c は 3 種の光学異性体を有するが, これらを E-64-c と比較する目的で合成した。その物理化学的性質を表 1 にまとめて示す。又, 本年度中に得られた E-64-c 及び関連物質の総計を表 2 にまとめた。

表 1 E-64-c とその光学異性体の物性

Configuration		mp (°C)	[α] _D (c=1, EtOH)	Elemental analysis Calcd. for C ₁₅ H ₂₆ N ₂ O ₅		
ES	Leu			C	H	N
				57.31	8.34	8.91
L	L	157-160	+45.5°(20°C)	Found 57.35	8.51	8.89
L	D	82-84	+86.7°(27°C)	57.22	8.42	8.81
D	L	83-85	-88.0°(29°C)	57.12	8.23	8.80
D	D	157-158	-39.0°(28°C)	57.44	8.43	8.73

ES, trans-epoxysuccinyl residue; Leu, leucine residue

* 大正製薬株式会社総合研究所

I 製造方法

表2 昭和55年度に製造した E-64-c
及びその標識体の総量

E-64-c	
L-L	2740g
L-D	0.9g
D-L	1.85g
D-D	0.5g
[¹⁴ C]E-64-c	11.6mCi
[³ H]E-64-c	2.9g

考 察

E-64-c の合成法に関しては昨年度既に報告した。この方法により、更に、スケールアップの可否を検討したが製造工程上、余り大きな問題はなく大量製造も可能である。しかしながら、主原料である L-トランスエポキシコハク酸製造上、非天然型、D-酒石酸から5行程を経て合成するという、行程上の問題と、原料である D-酒石酸が高価でかつ、安定した入手が

困難であるという大きな課題が残されている。この問題に関しては安価なフマル酸から得られる DL 体を分割する方法（昨年度一部報告）によりほぼ解決の見通しがついた。これについては別項で報告する。

参考文献

- 1) 今堀和友：私信。
- 2) S. Hashida, T. Towatari, E. Kominami, N. Katumuma: Inhibition by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L *in vitro* and *in vivo*, J. Biochem., 88, 1805, 1980.
- 3) 大関正弘：E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究，昭和54年度研究報告書 p. 25, 1980.
- 4) 大関正弘：E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究，昭和54年度研究報告書，p. 145, 1980.
- 5) 沢田二郎：E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究，昭和54年度研究報告書，p. 9, 1980.

2. DL-トランス-エポキシコハク酸の 光学分割法に関する研究

沢田二郎*

研究協力者 花田和紀* 玉井正晴* 小熊清司*

目 的

現在、E-64 及びその類縁体を筋ジストロフィー治療薬として開発することを目指し研究が進められている。これらの化合物は筋ジストロフィー症発症の一つの要因であると推定されている Ca^{++} -activated neutral protease (CANP) を強く阻害する。更に、今堀¹⁾は活性基であるトランス-エポキシコハク酸 (以下 t-ES と略) 部分が (2S, 3S) 配位を有する L 体の方が D 体よりも、極めて高い活性を示すことを報告している。従って、E-64 及びその類縁体をヒト筋ジストロフィー症治療薬として開発していく上で、工業的規模で実用可能な t-ES 製造法を確立することが極めて重要である。我々は既に報告²⁾した様に D-酒石酸より立体選択的に L-t-ES を合成する方法を確立したが、この方法は D-酒石酸が高価であり、しかも、安定に確保することが困難であるという難点がある。我々は既に昨年度、フマル酸から安価に製造出来るラセミ体 t-ES の分割法として種々のアミンを検討して、数種の有望な分割剤を発見した²⁾。本年度はこれらの中で最も実用性の高いと考えられる L-フェニルアラニンアミド (以下 L-Phe-NH₂ と略) 及びデヒドロアピエチルアミン (以下 DAA と略) についてその実用化に足るスケールアップ法を詳細に検討した。

方 法

L-Phe-NH₂ は既報の方法²⁾で合成した。DAA は市販品 (東京化成工業製) を W. J. Gottstein の方法³⁾で精製して用いた。DL-t-ES は G. B. Payne の方法⁴⁾に従ってフマル酸より合成した。L-t-ES の上記アミンとのジアステレオアイソマー塩形成による分割に際してのスケールアップに必要な諸条件を検討した。

結 果

前年度得られた分割剤の中で最も良い成績を示した L-Phe-NH₂ について 10 倍にスケールアップして塩形成の諸条件を検討した。表 1 に示す様に溶媒中の含水量を少なくすると塩の収率は多少上昇するが、その旋光度から、逆に純度が低下することが判った。表 2 に示す様に塩形成時の濃度は大きな影響を与えず、又、DL-t-

表 1 L-フェニルアラニンアミドによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割一塩形成用溶媒の検討—
溶媒量 : 30 ml
DL-t-ES : 30 m mol
L-Phe-NH₂ : 30 m mol

Solvent	Yield (%)	$[\alpha]_D^{25}(c=1, \text{MeOH})$
95% MeOH	49.1	+58.2°
98% "	77.7	+13.0°
100% "	66.7	+7.9°

* 大正製薬株式会社総合研究所

I 製造方法

表2 L-フェニルアラニンアミドによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割—DL-トランスエポキシコハク酸濃度の影響—

溶媒: 95% MeOH
DL-t-ES: 30 m mol
L-Phe-NH₂: 30 m mol

Solvent volume (ml)	Yield (%)	$[\alpha]_D^{25}(c=0.9, \text{MeOH})$
36	46.8	+62.9°
30	49.1	+58.2°
27	45.7	+57.1°
24	47.5	+58.3°
22	35.1	+61.8°

表3 L-フェニルアラニンアミドによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割—DL-トランスエポキシコハク酸と L-フェニルアラニン比の塩形成率に及ぼす影響—

溶媒: 95% MeOH 30 ml
DL-t-ES: 30 m mol

L-Phe-NH ₂ /DL-t-ES	Yield (%)	$[\alpha]_D^{25}(c=0.9 \text{ MeOH})$
1.0	49.1	+58.2°
1.1	36.3	+59.4°
1.2	64.6	+7.9°

表4 L-フェニルアラニンアミドによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割—スケールアップ—

A. Preparation of salt

DL-ES(g)	L-Phe-NH ₂ (g)	Solvent	Salt	
			Yield(g)	$[\alpha]_D$
0.396	0.492	95% MeOH	0.372 (84%)	+64.6°
27.7	34.4	"	26.1 (84%)	+61.3°

B. Separation

Salt(g)	Method	L-ES		
		Yield(g)	$[\alpha]_D$	Overall yield
0.354	Dowex 50 column	0.128 (81.1%)	+109.8°	68.0%
26.0	solvent extraction	8.34 (72.5%)	+115.4°	61.0%

ES と分割剤の比は表3に示す様に小スケールの場合と同様に1:1 (モル比) が良かった。この様に検討した範囲では、塩形成は既報の条件、即ち、95%メタノールに DL-t-ES 及び L-Phe-NH₂ を共に 1 m mol/ml の濃度で溶解し、結晶を析出させる条件が最も良い成績を示した。しかし、前年度の結果と比べると収率がかなり低かったが、この原因は DL-t-ES の純度にあることが判った。後述する様に95%以上の純度の原料を用いれば、大スケールでも収率は80%を越えた。

この塩から L-t-ES を分離するために、従来イオン交換樹脂を用いて来たが、これは大量処理には不適である。そこで、溶媒抽出法につ

いて検討したところ、硫酸々性水溶液より酢酸エチルで効率よく抽出分離しうることがわかった。収率はイオン交換樹脂法より若干落ちるが、得られた L-t-ES の純度は更に上昇した。

同条件下で約70倍のスケールで行った分割結果を表4にまとめて示す。

次いで、L-Phe-NH₂ よりもはるかに安価に入手出来る DAA について同様にスケールアップ条件を塩形成の際の溶媒として種々の含水量のエタノール及びアセトンについて検討した。表5に見られる様にエタノールの場合収率は高いが純度は低い。これを再結晶しても純度は上昇するが、収率は大幅に低下するので、アセトンを溶媒として用いる方がはるかに優れて

2. DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割法に関する研究

表5 デヒドロアピエチルアミンによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—塩作成用溶媒の検討—

DL-t-ES : 30 m mol DAA : 30 m mol

Solvent	Volume(ml)	Yield(%)	$[\alpha]_D^{25}(c=1, \text{MeOH})$
100% ethanol	10	108.6	+25.6°
95% "	10	98.4	+22.4°
95% acetone	40	78.1	+45.5°
90% "	30	65.5	+53.4°
85% "	15	62.0	+52.7°

表6 デヒドロアピエチルアミンによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—DL-トランスエポキシコハク酸濃度の影響—

溶媒 : 90%アセトン

DL-t-ES : 10 m mol DAA : 10 m mol

Solvent volume(ml)	Yield(%)	$[\alpha]_D^{25}(c=1, \text{MeOH})$
15	71.2	+48.1°
20	66.4	+51.5°
30	68.4	+50.7°
35	67.8	+51.8°

表7 デヒドロアピエチルアミンによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—DL-トランスエポキシコハク酸デヒドロアピエチルアミン比の塩形成
率に及ぼす効果—

溶媒 : 90%アセトン DL-t-ES : 10 m mol

DAA/DL-t-ES	Yield(%)	$[\alpha]_D^{25}(c=1, \text{MeOH})$
1.0	67.2	+52.6°
1.2	84.0	+49.2°
1.4	99.4	+48.0°
1.6	121.7	+42.2°
2.0	168.1	+34.3°

表8 DL-トランス-エポキシコハク酸のデヒドロアピエチルアミンによる大量分割
A. Preparation of salt

DL-ES(g)	DAA	Solvent	Salt	
			Yield(g)	$[\alpha]_D$
0.661	1.427	EtOH	0.56 (31.1%)	+50.8°
36.6	100	90% acetone	86 (83.8%)	+52.6°

B. Separation

Salt(g)	Method	L-ES		
		Yield(g)	$[\alpha]_D$	Overall yield
0.549	Dowex 50 column	0.081 (84.1%)	+115.9°	26.2%
86.0	solvent extraction	10.7 (66.1%)	+115.7°	55.4%

I 製造方法

いる。次に、DL-t-ES に対する溶媒量を検討したが大きな差異は認められなかった(表6)。一方、DL-t-ES と分割剤の比率は表7に示す様に分割効率に影響が認められ、収率及び純度を考慮して1:1.2~1.4が良いと思われる。

塩から L-t-ES の分離は前述の L-Phe-NH₂ の場合と同様に溶媒抽出により、アルカリ性水溶液よりクロロホルムで DAA を抽出して除いた後、水層を酸性にして酢酸エチルで L-t-ES を抽出することが出来た。

これらの結果をもとに既報のスケールの約55倍の規模にスケールアップしたところ、表8に示した様に通算収率が約2倍という好結果が得られた。

考 察

L-Phe-NH₂, DAA で分割する方法共に今後、更に工場スケールにまでスケールアップす

ることが可能であろう。しかしながら、実用面から見ると後者は極めて安価に入手出来る点、より有用である。しかも、用いた分割剤は溶媒抽出により約70~80%が回収可能であるので大規模になる程、コストダウンができるという利点がある。

参考文献

- 1) 今堀和友：私信。
- 2) 沢田二郎：L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究，昭和54年度研究報告書，p. 15, 1980.
- 3) W. J. Gottstein, L. C. Cheney: Dehydroabietylamine. A new resolving agent, J. Org. Chem., 30, 2027, 1965.
- 4) G. B. Payne, P. H. Williams: Reaction of hydroperoxide IV. Sodium tungstate catalyzed epoxidation of α , β -unsaturated acid, J. Org. chem., 24, 54, 1959.

3. E-64-c 標識体の製造

沢田 二郎*

研究協力者 花田 和紀* 玉井 正晴* 安達 孝*
小 熊 清 司*

目 的

昭和54年度における本事業の成果として合成 E-64-c が天然 E-64 に十分代替し得るという結果を得、既に [³H]-ラベル体を用い大関によりその生体内動態について報告されている¹⁾。本研究の目的は E-64-c の Ca⁺⁺-activated neutral protease あるいは Cathepsin 等に対する阻害機構の解明、及び代謝、生体内分布等、 [³H]-ラベル体による研究をふまえ、更に ¹⁴C 標識化合物により、より詳細に検討するためその試料として、 [¹⁴C]E-64-c を製造、提供することにある。あわせて、将来人にも適用が可能な [²H]-ラベル体を製造し、その応用性を動物レベルで検討する目的で活性基であるエポキシコハク酸部分に [²H] を導入した [²H]E-64-c を製造することにある。

方 法

[¹⁴C]E-64-c は L-[U-¹⁴C]Leucine を原料として既報の E-64-c 合成法²⁾に準じて、図 1 に示す様なルートで合成した。又、 [²H]E-64-c は図 2 に示す様に [2,3-²H]Fumaric acid を出発原料とし、K. Hanada 等の方法³⁾に準じて DL-trans-ethyl hydrogen epoxysuccinate を得、それを原料として E-64-c 合成法に準じて合成した。各反応を以下に述べる。

1. [¹⁴C]E-64-c の製造法

1) *t*-Butoxycarbonyl-L-[¹⁴C]leucine monohydrate.

L-[U-¹⁴C]Leucine (1.31g, 30 mCi) 及び triethylamine (1.52 g) の水溶液 (60 ml) に *t*-butyl-S-4,6-dimethylpyrimidine-2-ylthiocarbonate (4.4 g) の dioxane 溶液を氷冷攪拌下滴下した後、2時間室温で攪拌した。一夜放置後、水 (50 ml) を加え、ethylacetate (50 ml×2) で抽出した。水層を塩酸々性にして ethylacetate (50 ml×3) で抽出し、その有機層を 5%塩酸水及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥後、濃縮乾固した。得られた残渣をエタノール-水より結晶化し、そのまま次の反応に供した。

2) *t*-Butoxycarbonyl-L-[¹⁴C]leucyl isoamylamine.

上記 *t*-butoxycarbonyl-L-[¹⁴C]leucine monohydrate, 1-hydroxybenztriazol (1.62 g), N-methylmorpholine (1.21 g) 及び isoamylamine (1.044 g) の tetrahydrofurane 溶液 (2.5 ml) に氷冷攪拌下、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (2.3 g) を徐々に加え、氷冷下1時間、更に室温で2時間攪拌した後、一夜放置した。溶媒を留去後、残渣を水 (50 ml) に溶解し、ethylacetate (50 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ、5%塩酸水、飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し、乾燥後濃縮乾固し、2.31 g の目的物を得た。(収率: 1), 2) を通算して77%)

* 大正製薬株式会社総合研究所

I 製造方法

3) L-[¹⁴C]Leucyl isoamylamine.

t-Butoxycarbonyl-L-[¹⁴C]leucyl isoamylamine (2.31g) をギ酸 (2.5 ml) に溶解し、一夜放置後ギ酸を減圧下留去した。残渣に水を加え、NaOH 溶液でアルカリ性にした後、ethylacetate (50 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、乾燥後濃縮乾固し、1.36 g の目的物を得た。(収率: 88.3%)

4) N-[N-(L-3-trans-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-[¹⁴C]leucyl] isoamylamine.

L-[¹⁴C]Leucyl isoamylamine (1.36 g), L-ethyl hydrogen epoxysuccinate (1.28 g), 1-hydroxybenztriazol (1.08 g) 及び N-methylmorforine (0.81 g) を tetrahydrofurane (75 ml) に溶解し、氷冷攪拌下、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (1.48 g) を徐々に加え、室温で4時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣に水 (60 ml) を加えた後、ethylacetate (50 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ、5%塩酸水、飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄し、乾燥後濃縮乾固した。残渣を ethylether-n-hexane より結晶化し、1.67 g の目的物を得た。(収率: 71.7%)

5) N-[N-(L-3-trans-Carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-[¹⁴C]leucyl] isoamylamine ([¹⁴C]E-64-c)

N-[N-(L-3-trans-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-[¹⁴C]leucyl] isoamylamine (1.67 g) の ethanol 溶液 (10 ml) に ethanol-水混液 (4:1, 2.5 ml) に NaOH (2.9 g) を溶解して氷冷攪拌下滴下した後、室温で4時間攪拌した。10%塩酸水 (50 ml) を加えて酸性にした後、ethylacetate (70 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、乾燥後濃縮した。Ethylacetate-pet-ether より結晶化し、1.223 g の目的物を得た。(収率: 80.5%)

2. DL-[³H]-E-64-c の製造法

1) DL-[³H]-trans-epoxysuccinic acid.

[2,3-³H]Fumaric acid (10 g) 及び NaOH (5.16 g) の水懸濁液に Na₂WO₄·2H₂O (2.82

g) の30%過酸化水素水 (12 ml) 溶液を加え、NaOH 溶液 (1.72 g, 5 ml) で pH 4.2 に調整しながら、65°C で2時間攪拌した。残余 NaOH 溶液を加え、更に 85°C で1時間攪拌した後、BaCl₂·2H₂O (42 g) の水溶液 (100 ml) を加え2時間室温に放置した。生じた沈殿を沷取し、アセトンで洗浄後、乾燥した。得られた粉末を、H₂SO₄ (8.4 g) を含む ethylether (100 ml) に懸濁し、3時間攪拌抽出した。残渣より再抽出した ethylether 溶液を合わせ、濃縮乾固して目的物 6.75 g を得た。(収率: 60.1%)

2) DL-[³H]-trans-Diethylepoxysuccinate.

DL-[³H]-trans-Epoxysuccinic acid (6.75 g) 及び、p-toluensulfonic acid (0.486 g) を ethanol (300 ml) に溶解し、6時間煮沸還流した。溶媒を留去後、残渣を benzene (300 ml) に溶解し、飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し、乾燥後、溶媒を留去した。得られた油状物を減圧分留して目的物 6.93 g を得た。(収率: 73.5%)

3) DL-[³H]-trans-Ethyl hydrogen epoxysuccinate.

DL-[³H]-trans-Diethylepoxysuccinate (6.83 g) の ethanol 溶液 (13 ml) に氷冷攪拌下、KOH (2.24 g) の ethanol 溶液 (20 ml) を滴下し、氷冷下2時間、更に室温で1時間攪拌した。Ethylether (26 ml) を加え、生じた沈殿を沷取した。この沈殿の水溶液 (15 ml) を塩酸々性にした後、ethylacetate (20 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、次いで乾燥後濃縮乾固し目的物5.05 g を得た。(収率: 70%)

4) N-[N-(DL-[³H]-3-trans-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl] isoamylamine.

DL-[³H]-trans-Ethyl hydrogen epoxysuccinate (5.05g), L-leucylisoamylamine (6.6 g), 1-hydroxybenztriazol (4.46 g) 及び N-methylmorforine (3.33 g) の tetrahydrofurane 溶液 (250 ml) に氷冷攪拌下、1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (6.32 g) を徐々に加え氷冷下2

3. E-64-c 標識体の製造

時間攪拌後、一夜 5°C に放置した。溶媒を留去後、残渣に水 (100 ml) を加え、ethylacetate (100 ml × 2) で抽出した。有機層を合わせ、5% 塩酸水、飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し、乾燥後濃縮乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (chloroform) で精製して目的物 4.65 g を得た。(収率 43%)

5) N-(N-(DL-[²H]-3-*trans*-Carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl) isoamylamine ([²H]E-64-c)

N-(N-DL-[²H]-3-*trans*-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl] isoamylamine (4.65 g) の ethanol 溶液 (26 ml) に NaOH (0.72 g) の 80% 含水 ethanol 溶液を氷冷攪拌下滴下した後、更に室温で 3 時間攪拌した。反応液に 5% 塩酸水 (50 ml) を加えて酸性にした後、ethylacetate (70 ml × 3) で抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、次いで乾燥後濃縮乾固し目的物 2.89 g を得た。(収率 : 69%)

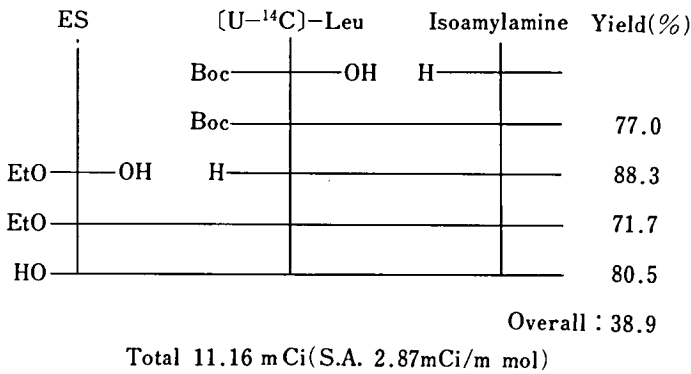


図1 [¹⁴C]E-64-c の製造行程

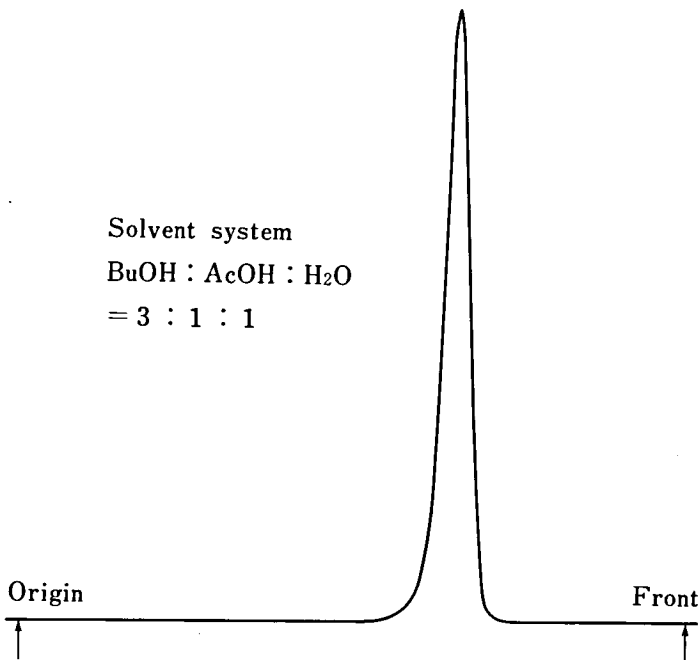


図2 [¹⁴C]E-64-c のラジオクロマトグラム

I 製造方法

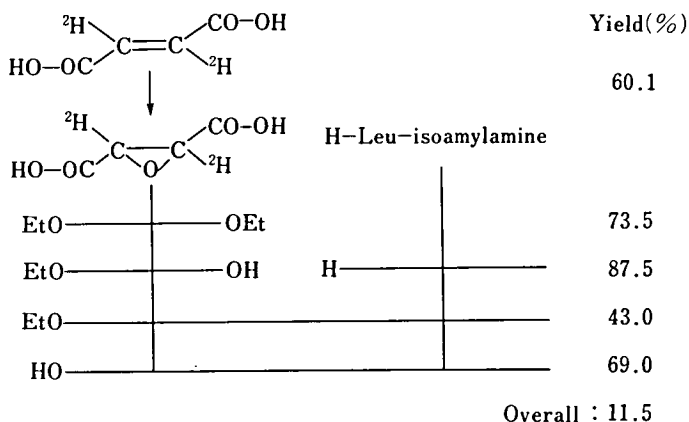


図3 DL-[²H]E-64-c の製造行程

結果

[¹⁴C]E-64-c は図1に示した様に L-[U-¹⁴C]Leucine より5段階の反応を経て得られた。第1段階の Boc 化反応の際、原料の L-[U-¹⁴C]Leucine が稀薄水溶液であるため反応が十分進行しないことが予備実験でわかった。又、水溶液を濃縮すると分解の恐れがあるので反応条件を検討し、Boc 化試薬を倍量用いることにより問題を解決することが出来、全行程の通算収率で最終的に 11.6 mCi の目的物 (比活性 2.87 mCi/m mol) を得ることが出来た。最終産物は、図2に示した以外の展開溶媒でも TLC のラジオクロマトグラムで単一ピークを示し、放射化学的に純粋であることが確認出来た。同時に、種々の発色剤で定性的に調べたが、不純物は検出されず、極めて高純度であることが認められた。

[²H]E-64-c の製造ルートは図3にまとめた。この方法ではフマル酸から DL-トランスエポキシコハク酸が得られるため、最終産物はエポキシコハク酸部分が D 及び L 体のジアステレオアイソマーの混合物である。DL-トランス-エポキシコハク酸のエステル化の際、従来は触媒として硫酸を用いていたが、カトルエンシルホン酸を用いることにより、硫酸触媒法の平均収率より約10%高い収率でジエステルを得ることが出来た。以上の方法により 2.9 g の

DL-[²H]E-64-c を得た。

考察

E-64-c の酵素阻害活性基は L-トランス-エポキシコハク酸部分にある。従って、生体内動態、特に標的組織への分布を調べるには、この活性基の代謝を追跡することが極めて大切である。しかしながら、現段階では L-トランス-エポキシコハク酸部分を [¹⁴C] で標識することは合成上極めて困難である。

大関らは [³H]E-64-c を皮下投与し、放射活性の大部分は未変化体 E-64-c であることを報告している。この事実より、ロイシン部分に標識した E-64-c もその用途により十分利用しうると期待される。又、得られた標品は極めて純度が高く、十分に実験に供しうることがわかった。

しかし、経口投与の場合、トランス-エポキシコハク酸とロイシンの間の結合が一部切断されるという結果が得られているので、代謝産物を詳細に検討する際、トランス-エポキシコハク酸部分に [²H] 標識された化合物は有用な武器となりうると考えられる。又、本品は上述の如く、DL-混合物であり、収率も若干低い、別項に報告した様に DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割も可能であるので、今後、目的に応じ光学的に純粋な [²H]E-64-c の製造も可能である。

3. E-64-c 標識体の製造

参考文献

- 1) 大関正弘：E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究，昭和54年度研究報告書 p. 145, 1979.
- 2) 沢田二郎：E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究，同上 p. 9.
- 3) K. Hanada, M. Tamai, S. Morimoto, T. Adachi, S. Ohmura, S. Sawada, I. Tanaka: Inhibitory activity of E-64 derivatives on papain, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 537, 1978.

4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討

沢田二郎*

研究協力者 和志武三徳* 林英文* 玉城正夫*
小沢康雄* 小山郁夫* 中池郁子*

目 的

E-64-c はヒト進行性筋ジストロフィー症に対する薬効が期待され、その治療薬として適用するために多角的検討がなされてきており、標的酵素である Ca^{++} -activated neutral protease 及びカテプシン B, L 等に対する阻害活性を有することが既に確認されている^{1),2)}。

一方、E-64-c をモデル疾患動物において評価する場合、投与条件が血中濃度に影響し、さらには作用部位である筋肉細胞内の濃度にも影響することが考えられる。

本研究の目的は、最も有効な投与ルート、剤形などを定めるにあたって必要な基本的データである E-64-c の物理化学的性質及び生体に投与した場合の薬動力学的パラメーターを明らかにし、次にこれらに基づき基礎的な製剤化の検討をすることにある。

1. 物理化学的性質

方 法

本実験に用いた試料は当研究所において合成されたもので、構造式、化学名、分子式、分子量及び元素分析値を表1に示す。

また、日本薬局方通則及び一般試験法により測定した性状、融点、重金属、ヒ素、塩化物、乾燥減量及び強熱残分の結果は表2のとおりで

あった。

(1) 各種溶媒に対する溶解性

各種溶媒に対する溶解性を日本薬局方通則に従って試験した。

(2) 解離定数 (pKa)

解離定数を滴定法³⁾により求めた。本品 157 mg をとり、新たに煮沸し冷却した蒸留水 47.5 ml を加えて溶かす。この液を窒素気流中で攪拌しながら 0.1 N 水酸化ナトリウム液 ($f=0.943$) で滴定した。

(3) 旋光度

本品 0.1 g を精密に量り、測定溶媒を加えて溶かし正確に 10 ml とする。この液につき、層長 100 mm の測定管を用いて日本薬局方一般試験法の旋光度測定法により測定し、比旋光度 ($[\alpha]_D^{20}$) を求めた。

(4) 分配係数

本品の 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の酢酸エチル溶液を調製する。この液 20 ml ずつを正確にとり、それぞれに pH 1 の 0.2 M 塩化カリウム-塩酸緩衝液及び pH 2.5, 4.5, 7.0, 9.0 の Britton-Robinson 緩衝液各 20 ml を加え、37° で 1 時間振盪する。遠心分離した後、水層及び有機層中の E-64-c の濃度を液体クロマトグラフ法⁴⁾により定量し、分配係数を求めた。

(5) 吸湿性

本品約 0.5 g をガラス容器にとり、105° で 2 時間乾燥した後、相対湿度 54% (臭化カリウム飽和溶液)、75% (塩化ナトリウム飽和溶液) 及び 82% (塩化カリウム飽和溶液) のデンケー

* 大正製薬株式会社総合研究所

I 製造方法

表1 E-64-c の構造

Structural formula				
Chemical name	N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-3-methylbutylamine (E-64-c)			
Molecular formula	C ₁₅ H ₂₆ N ₂ O ₅			
Molecular weight	314.38			
Elementary analysis	Anal.	C, 57.31	H, 8.34	N, 8.91
	Found	C, 57.35	H, 8.51	N, 8.89

表2 品質試験

Impurities	Determination method	Result
Description		White crystals or crystalline powder with odourless and a slightly bitter taste
Melting point	J. P. 9 First method	156.0°
Heavy metals	J. P. 9 Second method	<10 ppm
Arsenic	J. P. 9 Third method	<2 ppm
Chloride	J. P. 9	<0.036%
Loss on drying	J. P. 9 (1 g, 105°, 2 hr)	0.32%
Residue on ignition	J. P. 9	0.03%

ター中に入れ、40°の恒温室に7日間放置し、重量増加率(%)を化学はかりを用いて測定した。

(6) 赤外吸収スペクトル

本品3mgに臭化カリウム0.5gを加え、乳鉢で粉碎混合したものにつき、日本薬局一般試験法の赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法により測定した。

(7) 核磁気共鳴スペクトル

本品0.04gに重アセトン0.4mlを加えて溶かした液につき、内部基準として添加したテトラメチルシランのシグナルを0ppmとし、60MHzの共鳴周波数で水素核について0~12ppmの範囲を掃引した。

(8) 熱分析

本品約0.01gをとり、α-アルミナを対照とし、室温から350°まで10°/分で昇温させ、示差走査熱分析(DSC)及び熱重量分析(TG)を行った。

(9) X線回折

本品をめのう乳鉢で粉碎した後、ホルダーにつめ、X線発生管球対陰極は銅(ニッケルフィルター)、ゴニオメータ走査速度は毎分1°(2θ)の条件で測定した。

(10) 定量法(滴定法)

本品を乾燥し、その約0.5gを精密に量り、中和エタノール20mlを加えて溶かし、更に水30mlを加えた後、0.1N水酸化ナトリウム液(f=1.083)で滴定した(指示薬:ブロムクレゾールグリーン試液4滴)。ただし、滴定の終点は液の黄色が青色になるときとする。

0.1N水酸化ナトリウム液1ml
=31.438mg C₁₅H₂₆N₂O₅

(11) 水溶液中での安定性

各種pH(3~10)のBritton-Robinson緩衝液を用い、本品の濃度20μg/mlの溶液を調製する。この液をガラスアンプルに充てんし、65°保存における残存率の経時の変化を液体クロマトグラフ法⁴⁾により測定した。また、同様

4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討

表3 各種溶媒に対する溶解性

Solvents	Solubility Solvent(ml)/Solute(1 g)	Descriptive term in J. P. 9
Methanol	0.9	Very soluble
Dehydrated ethanol	1.4	Freely soluble
Acetone	4.3	Freely soluble
Dioxane	25	Soluble
Ethyl acetate	44	Sparingly soluble
Dichloromethane	150	Slightly soluble
Water	250	Slightly soluble
Ether	850	Slightly soluble
n-Hexane	> 10,000	Practically insoluble

表4 解離定数 (25°)

0.1 N NaOH added(ml)	pH	$\log \frac{[\text{HA}] - [\text{H}^+]}{[\text{A}^-] + [\text{H}^+]}$	pKa
0	2.32		
0.5	2.39	0.00	2.39
1.0	2.46	-0.06	2.40
1.5	2.52	-0.15	2.37
2.0	2.60	-0.23	2.37
2.5	2.70	-0.31	2.39
3.0	2.80	-0.42	2.38
3.5	2.92	-0.55	2.37
4.0	3.09	-0.70	2.39
4.5	3.33	-0.94	2.39
Mean [pKa]			2.38

にして pH7.4 の 1/15 M リン酸塩緩衝液中における安定性を 65°, 80° 及び 100° 保存について検討し, 温度依存性を調べた。

結果及び考察

各測定結果を表3～9及び図1～6に示す。各種溶媒に対する溶解性はメタノールに極めて溶けやすく, 無水エタノール又はアセトンに溶けやすく, ジオキサンにやや溶けやすく, n-ヘキサンにほとんど溶けなかった(表3)。pKaは2.38であり, エポキシ基の電子吸引性により強い酸性を示した(表4)。旋光度は無水エタノール及びジオキサンのいずれの溶媒においても右旋性を示し, 比旋光度はそれぞれ +44.4° 及び +10.0° であった(表5)。酢酸エチル-水系における分配係数は通常の一塩基酸と同様に pH が高くなるにつれて減少した(表6)。

表5 各種溶媒中における比旋光度 ($[\alpha]_D^{25}$)

Solvents	$[\alpha]_D^{25}(c=1.0)$	Mean
Dehydrated ethanol	+44.4°	+44.4°
	+44.5°	
	+44.3°	
Dioxane	+10.1°	+10.0°
	+ 9.8°	
	+10.0°	

表6 分配係数 (37°)

pH	Ethyl acetate/Water*
1.0	44.3
2.5	14.7
4.5	0.15
7.0	<0.01
9.0	<0.01

*Britton-Robinson buffer

I 製造方法

表7 吸湿性 (40°, 7日間)

Relative humidity (%)	No.	Equilibrium moisture absorbed (%)	Mean (%)
54	1	0.0	0.0
	2	0.0	
	3	0.0	
75	1	0.0	0.0
	2	0.0	
	3	0.0	
82	1	0.0	0.0
	2	0.0	
	3	0.0	

表8 定量値

No.	Assay Results (%)
1	99.4
2	99.6
3	99.4
4	99.5
5	99.6
6	99.7
7	99.6
Mean	99.5
S. D.	0.11

表9 水溶液中での安定性 (65°)

Time in Days	Residual content (%)							
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	pH 10.0
Initial	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	82.2	92.2	94.6	97.0	98.0	95.0	94.5	89.4
12	69.1	77.5	77.8	78.9	78.9	77.5	76.0	67.7
24	47.8	58.8	62.6	61.8	61.3	59.5	54.5	46.2
38	30.6	43.5	47.1	47.3	48.2	42.5	39.1	27.6

吸湿性は全く認められなかった(表7)。赤外吸収スペクトルの主な吸収帯はそれぞれ 3250 cm^{-1} は N-H 伸縮振動, 2950 cm^{-1} は C-H 伸縮振動, 1720 cm^{-1} はカルボキシル C=O 伸縮振動, 1680 cm^{-1} 及び 1620 cm^{-1} はアミド C=O 伸縮振動, 1570 cm^{-1} は N-H 変角振動, 890 cm^{-1} はエポキシ環の逆対称環伸縮振動の吸収に矛盾なく帰属することができた(図1)。核磁気共鳴スペクトルの $\delta 0.83$ 及び $\delta 0.92$ の 12H に相当するシグナルはロイシル基及び3-メチルブチルアミンのメチル基プロトンに, $\delta 1.29\sim 1.67$ の 6H に相当する多重線はロイシル基のメチレン基及びメチン基プロトン並びに3-メチルブチルアミンの2位メチレン基及びメチン基プロトンに, $\delta 3.21$ の 2H に相当する四重線 (J=7 Hz) は3-メチルブチルアミンの1位メチレン基プロトンに, $\delta 3.54$ 及び $\delta 3.65$ の 2H に相当する2つの二重線 (J=2 Hz) はエポキシ環のプロトンに, $\delta 4.49$ の 1H に相当する四重線 (J=7 Hz) はロイシル

基の α メチン基プロトンに, $\delta 7.60$ 及び $\delta 7.74$ の 2H に相当するシグナルは2つの NH プロトンに, $\delta 10.13$ の 1H に相当する幅広いシグナルはカルボキシル基のプロトンにそれぞれ帰属することができた(図2)。熱分析は 153° に融解による鋭い吸熱ピークを示し, 190° 付近に熱分解による発熱ピークと急激な重量の減少を示した(図3)。X線回析は結晶性を示した(図4)。定量法は 0.1 N 水酸化ナトリウム液を用い, ブロムクレゾールグリーンを指示薬とする中和滴定法について検討したところ, 良好な結果を得た(表8)。水溶液中での安定性については, 残存率の経時的变化(表9)から E-64-c の分解は一次反応式に従うことがわかった。分解反応速度定数 k を求め, pH と log k の関係を示した(図5)。この結果, 分解反応速度定数の対数は pH 3~10 の範囲で大きな変化を示さなかった。また, pH 7.4 におけるアレニウスプロット(図6)より得られた直線の傾きから活性化エネルギー E_a は 23.2 kcal/mole であ

4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討

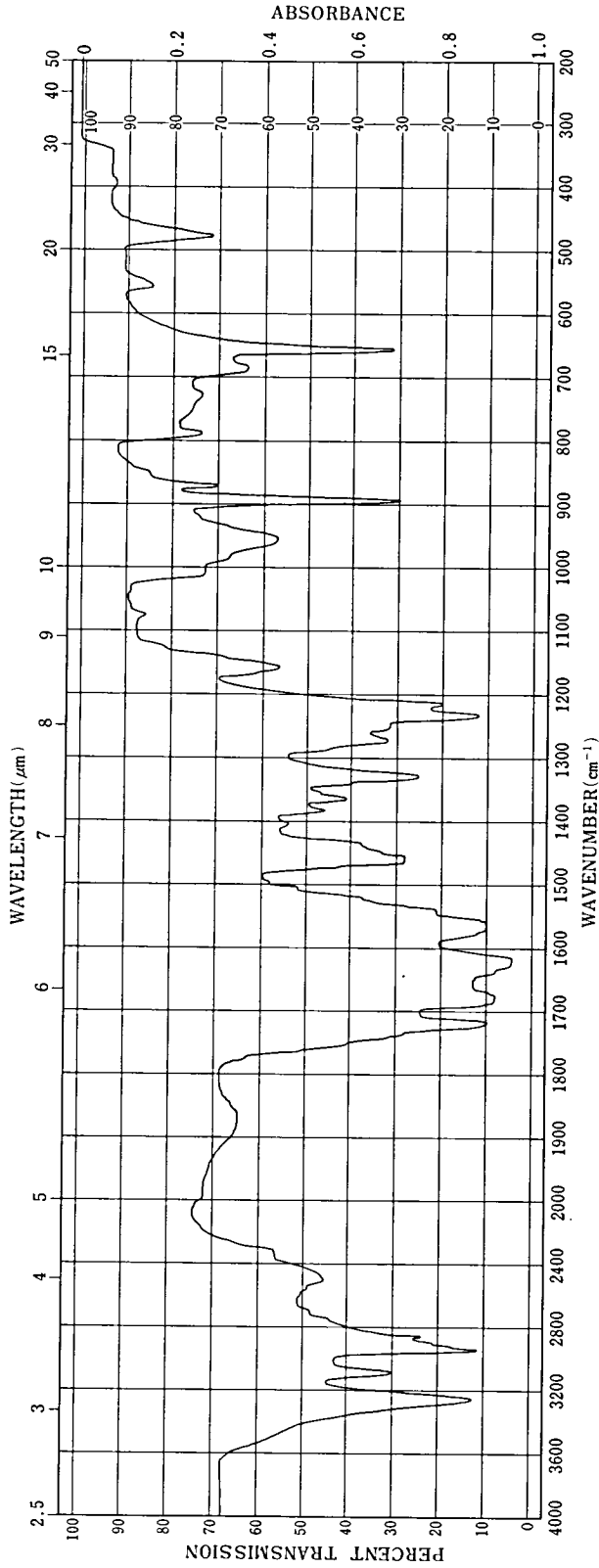


図1 赤外吸収スペクトル

I 製造方法

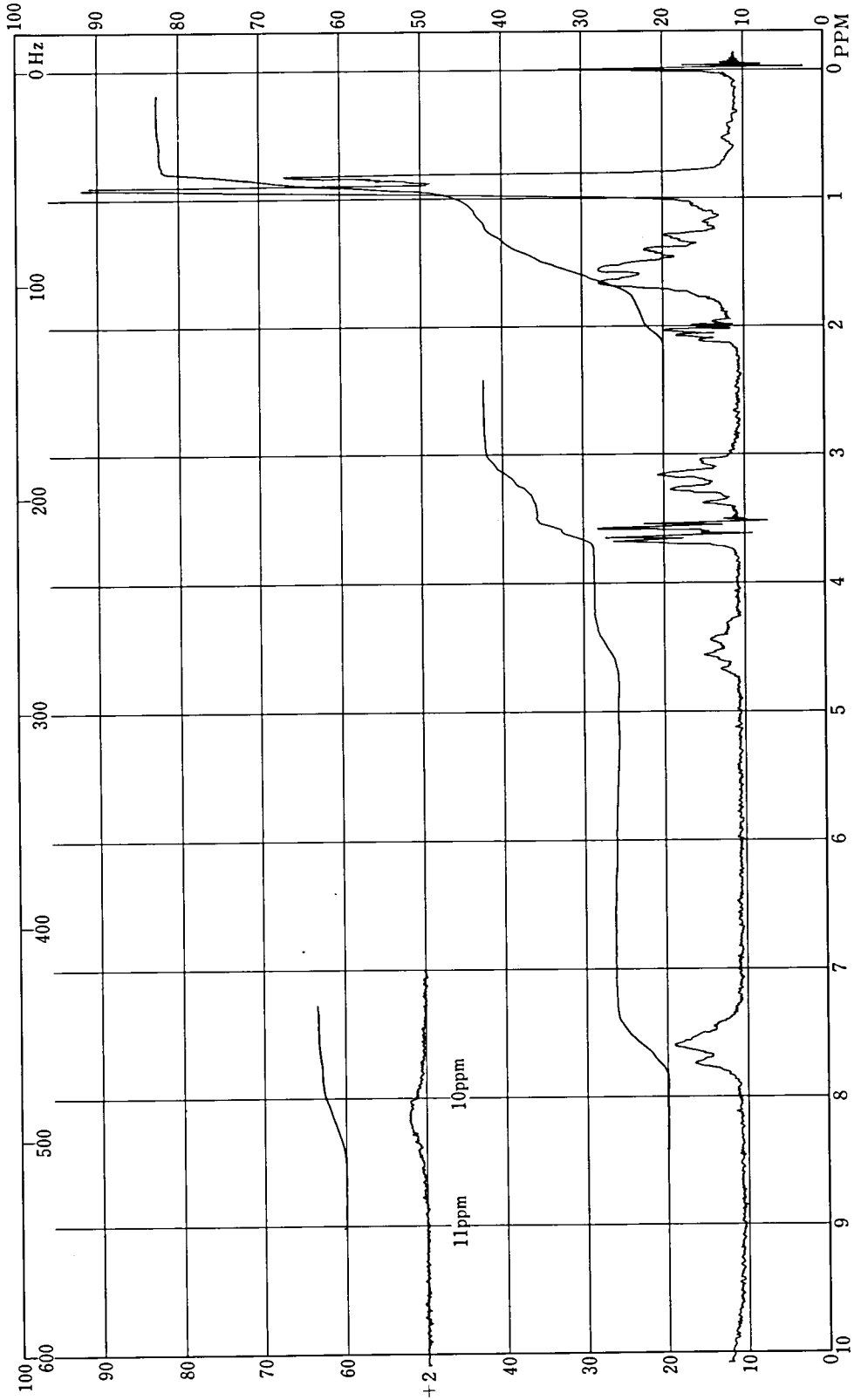


図2 核磁気共鳴スペクトル

4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討

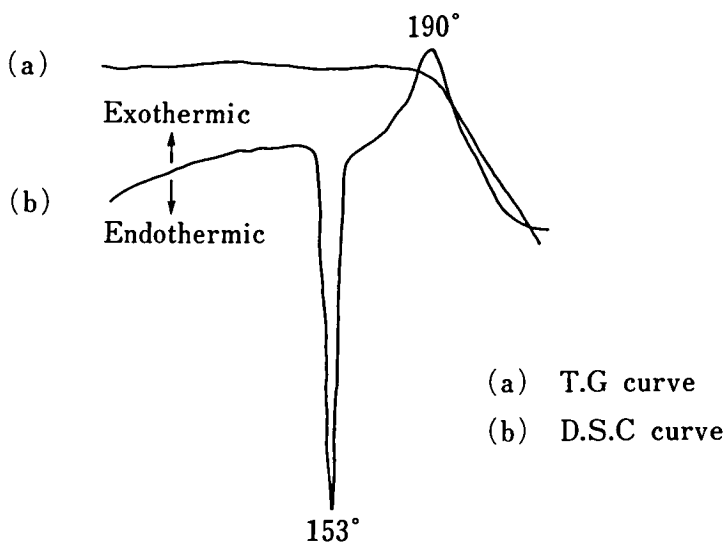


図3 熱分析

り、25° 保存における分解反応速度定数及び 90 % 残存期間はそれぞれ $1.68 \times 10^{-4} (\text{day}^{-1})$, 627 (day) と予測された。この結果より、水溶液の製剤化には若干の安定化が必要である。

2. 製剤化検討

方法

(1) 使用動物

ウサギは日本白色在来雄性体重約 3 kg を、犬はビーグル犬雌性体重約 10 kg を用いた。

(2) 投与方法

ウサギの静注は耳静脈より、犬は前腕静脈よりそれぞれ投与した。経口投与と直腸投与は 24 時間絶食後、試験に供した。筋注は大腿四頭筋肉へ、また皮下注は背部皮下にそれぞれ投与した。

(3) 投与製剤の調製

1) 静注パラメーターの算出に用いた処方

2 % 重曹水溶液に E-64-c を 5, 20, 50 mg/ml の濃度に溶解した。

2) 投与ルートの検討に用いた処方

E-64-c に水酸化ナトリウム水溶液を適量用いて溶解 (Na sol.) し、これに注射用蒸留水を加えて 10% 溶液を調製した。

3) 製剤化の検討に用いた処方

水溶液、水性懸濁液、油性懸濁液及びエマルジョンの各基剤について調製し、E-64-c の濃度はいずれの基剤も 10% とした。水溶性基剤としては投与ルートの検討に用いた処方 (Na sol.) を基本処方とし、これにポリビニルピロリドン を 10% 配合した処方 (PVP sol.)、ニコール BC-15 TX を 5% 配合した処方 (BC-15 TX)、更に、ニコール MYS-25 とリノール酸をそれぞれ 5% 配合した処方 (MYS-25, oil) の 3 処方を調製した。エマルジョン剤としては基本処方にコーン油を 84% とニコール SO-15 を配合した油中水型の処方 (W/O emul.) を調製した。水性懸濁剤としては 1% の CMC 水溶液に E-64-c を 10% 懸濁した処方 (CMC susp.) を、また、油性懸濁剤としてはコーン油に E-64-c を 10% 懸濁した処方 (Oil susp.) をそれぞれ調製した。

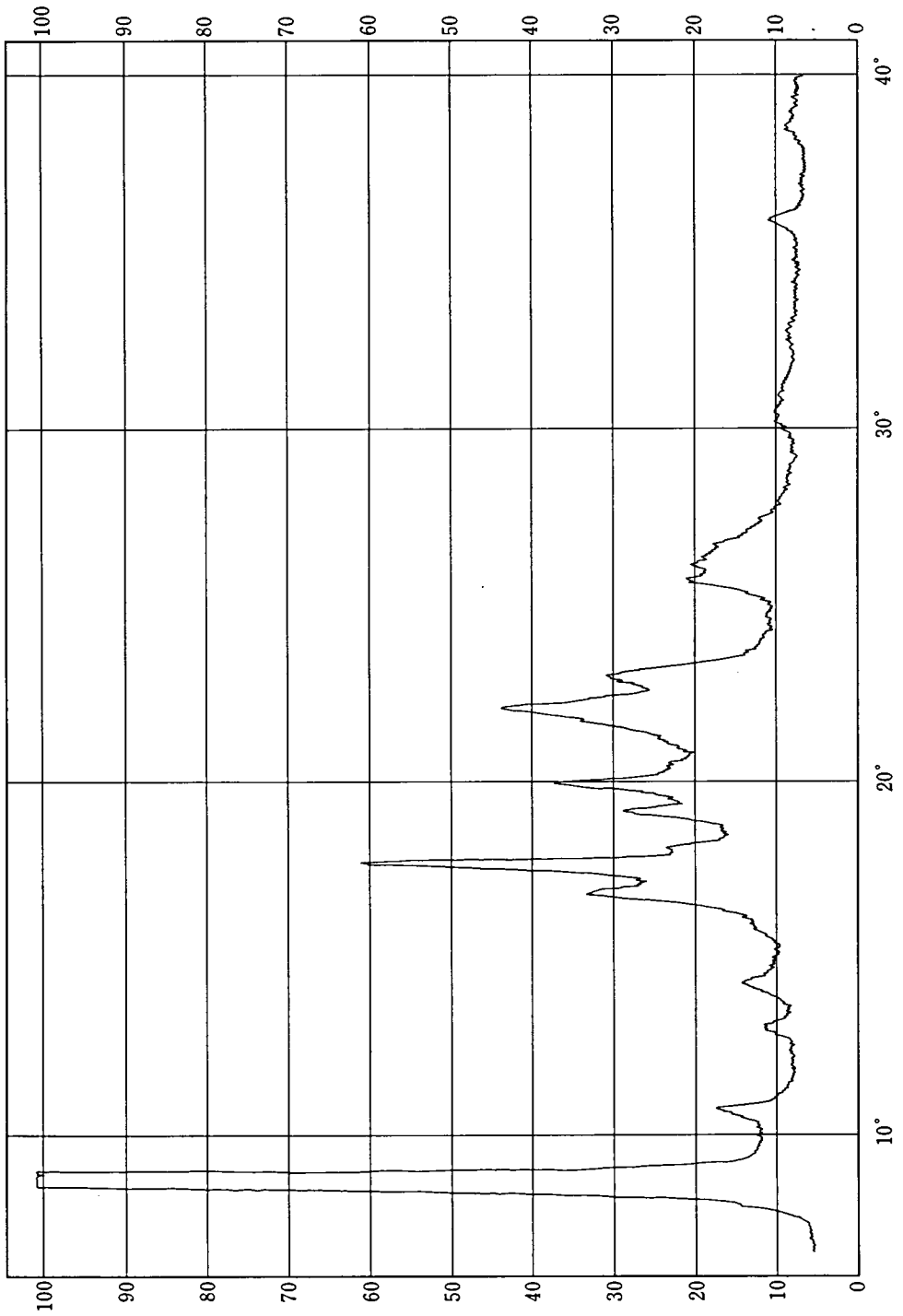
4) 採血法

ウサギは耳静脈より、犬は前腕静脈より、いずれもヘパリン処理注射筒にて採血した。

5) 定量法

血中の E-64-c の定量は沢田⁴⁾らの液体クロマトグラフ法で実施した。供試動物の血漿 0.5 ml に 5% リン酸溶液 0.5 ml を加えた後、分光分析用酢酸エチル 7 ml を加えてよく振り混ぜ、

I 製造方法



2 θ
圖4 X線回折

4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討

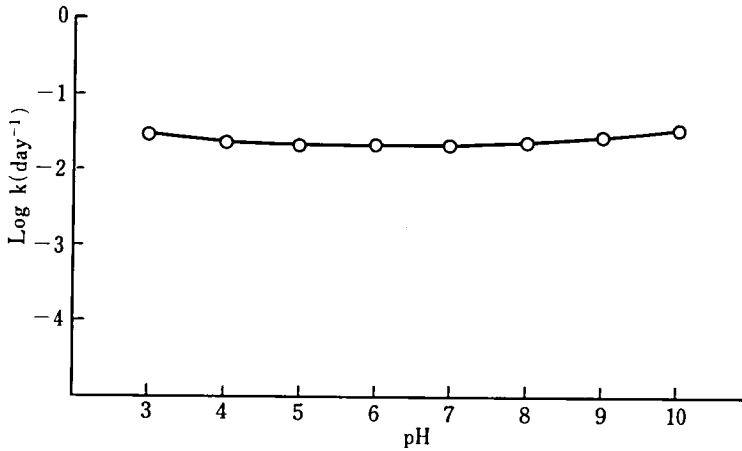


図5 pH プロファイル (65°)

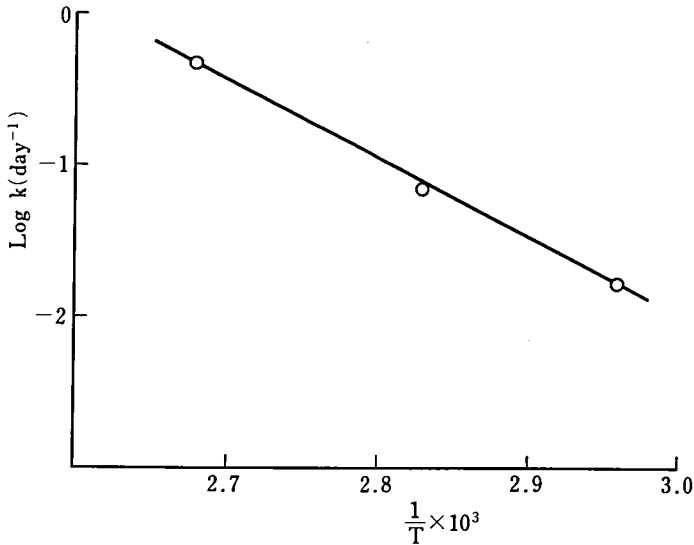


図6 アレニウスプロット (pH 7.4)

3分間遠心分離 (3000 r. p. m.) する。この酢酸エチル層 5 ml を分取し、減圧下に濃縮する。残留物を溶離液 0.5 ml に溶かし、この液を液体クロマトグラフの試料とする。E-64-c の標準溶液とのピーク比から血漿中濃度を算出した。

結果及び考察

一般に製剤化にあたっては主薬の物理化学的、生物薬剤学的な性質を明らかにし、生体に適用されたときの条件を配慮して、投与ルー

ト、剤形を決定する。E-64-c の生体内挙動については既に大関⁹⁾らによる報告がある。これによると E-64-c は経口投与では血中、尿中ともにほとんどが代謝物として存在しているのに対し、皮下注及び筋注では未変化体として存在し、静注した場合には血中からの消失は速やかであることが明らかとなっている。我々はこれらの事実をもとに E-64-c の製剤化について基礎的検討を加えた。

(1) E-64-c の静注パラメーター

種々のルートから投与された E-64-c はまず

