

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60年度研究報告書

班長 今堀和友

昭和61年3月

ま え が き

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）の開発研究が開始されたのは昭和54年度であった。以来7年間に亘る研究を積み重ねて、E-64はその合成類似体であるE-64-c、さらにそのエステル体であるE-64-d（EST）と、より実用に適するものへと変化してきた。今回これがロキシスタチンの名のもとに、厚生省に医薬品製造承認申請を行ったことによって、本研究の歴史を閉じることとなったのである。

私がカルシウム依存性プロテアーゼの研究を行ってきたことを聞きつけ、当時大正製薬におられた沢田さんがE-64を持参し、阻害剤として有用かどうか検定してくれるよう依頼されたのが始まりであった。その後、この結果について行った日本医学会での私の講演が、厚生省の渡辺さんの耳に止まり、難病治療薬の開発研究に加えられたのである。

私は、まず *in vitro* 系における生化学研究を徹底的に行い、それに立脚しつつ順次 *in vivo* 系へと広げ、最後に臨床実験に持ち込むという方針を立て、それを実行した。したがって第1相臨床試験が報告されたのは、57年度からであった。この間基礎研究に集中したため、その方面の研究は大いに進歩したが、応用方面に携わられた方々はさぞもどかしく思われたことと思う。しかし最後まで私の方針に従い、協力して下さった班員の方々、および大正製薬開発部の方々に深甚なる敬意と謝意とを表するものである。

本研究期間を通じて、厚生省薬務局の方々より賜わった御援助の数々は挙げるに暇がない程である。今回の成果が少しでもこれらの御援助に応えるものとなることを心から念じて、本研究の締めくくりとしたい。

班長 今 堀 和 友

目 次

まえがき

I E-64 類縁体の開発

1. EST の製剤化に関する研究大関 正弘 9
2. EST 代謝物 (M-4-b) の合成検討大関 正弘 23
3. EST 代謝物 (M-4) の同定およびヒトにおける体内動態大関 正弘 27

II 酵素・細胞・組織レベルにおける研究

4. カルシウム依存性中性プロテアーゼのモノクロナル抗体.....今堀 和友 37
5. CANP 遺伝子の発現鈴木 紘一 41
6. 細胞内カルシウム依存性プロテアーゼの動態に対する
E-64 の作用——鶏胚筋分化と蛋白分解——.....野々村禎昭 47
7. EST のリソゾーム酵素の分解抑制効果について勝沼 信彦 49

III 個体レベルにおける研究

8. EST 連続投与によるラット, マウス, ハムスター肝薬物
代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響.....北川 晴雄 55
9. EST の一般薬理作用
——ウサギ横隔神経高頻度同期波, 筋ジストロフィー
ハムスターの心電図および摘出臓器標本に及ぼす影響—— ...福原 武彦 61
10. 種々の原因による筋萎縮に対する EST の効果
——筋肉内アミノ酸代謝の面より寺尾 寿夫 79
11. 心筋症ハムスターの心筋構造蛋白の融解機序に
関する一考察柴田 宣彦 85
12. ハムスター呼吸筋の組織所見.....石原 傳幸 91

13. 生検筋における rimmed vacuole の検討石原 傳幸 95
14. EST による実験的クロロキンミオパチーの治療効果.....杉田 秀夫 101

IV 臨床試験

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する
EST の臨床的検討宮武 正 109
16. EST 臨床試験石原 傳幸 123
17. Duchenne 型筋ジストロフィーに対する
システインプロテアーゼの特異的阻害剤 EST の効果中野 今治 129
18. EST 臨床試験初期報告書.....松原 四郎 139
19. Distal myopathy with rimmed vacuole に対する
EST の臨床試験杉田 秀夫, 宮武 正 151

I E-64 類縁体の開発

1. EST の製剤化に関する研究.....大関 正弘
2. EST 代謝物 (M-4-b) の合成検討大関 正弘
3. EST 代謝物 (M-4) の同定およびヒトにおける体内動態大関 正弘

1. EST の製剤化に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 小 団 扇 省 三* 小 沢 康 雄* 吉 田 継 親*
根 本 正 美* 山 田 憲 司* 吉 田 一 義*
田 中 唯 夫* 栗 山 恵 美 子* 堀 内 宏 美*
相 沢 則 子*

目 的

筋ジストロフィー症治療薬 EST の原体および製剤（エステルカプセル 50，エステルカプセル 25 およびエステル顆粒 10%）に関して、「長期及び苛酷経時変化試験」により、安定性を予測し、「強制分解試験」により、原体の水溶液中での分解経路を推定する。

また、健常成人を対象に「生物学的同等性試験」を実施し、各製剤の生物学的利用率に差が無いことを確認する。

方 法

1. 試料

EST 原体：

大正製薬株式会社で合成された純度 98.0～102.0%の原体。

エステルカプセル 50：

大正製薬株式会社で製造された 1 個中に EST を 50 mg 含有する硬カプセル剤。

エステルカプセル 25：

大正製薬株式会社で製造された 1 個中に EST を 25 mg 含有する硬カプセル剤。

エステル顆粒 10%：

大正製薬株式会社で製造された 1 g 中に EST を 100 mg (10%) 含有する顆粒剤。

以上の試料は、医薬品の製造許可申請書に添付した各々の「規格及び試験方法」に適合した。

2. 安定性試験

安定性試験の概略を表 1 に、保存条件・期間・容器および試験項目を表 2 に示す。

性状（原体および製剤）：

日本薬局方通則に従い試験した。

カルボン酸エステルの確認（原体および製剤）：

アルカリの存在下で塩酸ヒドロキシルアミンと反応させ、ヒドロキサム酸とし、これに塩化第二鉄を作用させ、色を観察した。

アミノ基の確認（原体および製剤）：

塩酸で加水分解し、生成するアミノ基にニンヒドリンを作用させ、色を観察した。

赤外吸収スペクトルによる確認（原体のみ）：

日本薬局方一般試験法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、特性吸収の波数から確認した。

液体クロマトグラフ法による確認（製剤のみ）：

製剤の定量で得られた液体クロマトグラムにおいて、試料溶液および標準溶液の EST に相当するピークの、内標準物質チモールとのピークに対する相対保持時間を比較した。

旋光度（原体のみ）：

日本薬局方一般試験法旋光度測定法に従い試験した。

融点（原体のみ）：

日本薬局方一般試験法融点測定法の第 1 法により試験した。

類縁物質（液体クロマトグラフ法）（原体および製剤）：

試料につき、EST 濃度が原体約 2 mg/ml、

* 大正製薬株式会社総合研究所

I E-64 類縁体の開発

表1 安定性試験の概略

		原体	製 剤			
			カプセル剤		顆粒剤	
			エステル カプセル50	エステル カプセル25	エステル 顆粒10%	
安定比較試験	エステルカプセル50 と エステルカプセル25	—	○	○	—	
	PTP包装と 缶包装	—	○	—	—	
経時 変化 試験	長期保存 試験	A法	—	—	○	
		B法	○	○	—	
	加速試験	—	—	—	○	
	苛酷 経時 変化 試験	加温保存 試験	○	○	—	○
		加温・加湿 保存試験	○	○	—	○
		光照射 保存試験	○	○	—	○
強制分解試験	○	—	—	—		

製剤約 1 mg/ml になる様に無水エタノールに溶解し、次の 2 条件の液体クロマトグラフ法によって試験を行い、得られたクロマトグラムのピーク面積から類縁物質の量を算出した。

[操作条件]

検出器：紫外吸光度計（測定波長：210 nm）

カラム：内径 4 mm，長さ 150 mm のステンレス管にオクタデシルシリル化した 5 μm のシリカゲルを充てんした。

カラム温度：50°

移動相：条件 1

H₂O : CH₃CN : H₃PO₄
= 720 : 280 : 1

条件 2

H₂O : CH₃CN : H₃PO₄
= 600 : 400 : 1

流 量：1 ml/min

注入量：5 μl

類縁物質（薄層クロマトグラフ法）（原体および製剤）：

試料につき、EST 濃度が約 10 mg/ml になる様に無水エタノールに溶解し、次の 3 条件の薄層クロマトグラフ法によって試験を行った。

[操作条件]

薄層板：TLC プレートシリカゲル 60

層の厚さ 0.25 mm（Merck 社製）

展開溶媒：条件 A

CHCl₃ : CH₃OH : HCOOH
= 95 : 5 : 2

条件 B

CH₃COOC₂H₅ : n-C₆H₁₄ : HCOOH
= 35 : 15 : 1

条件 C

C₂H₅OC₂H₅ : HCOOH
= 50 : 1

1. EST の製剤化に関する研究

表 2 保存条件・期間・容器および試験項目

試験項目	原 体			カ プ セ ル			製 剤		
	ロットNo.	保 存 条 件	保 存 容 器	ロットNo.	保 存 条 件	保 存 容 器	ロットNo.	保 存 条 件	保 存 容 器
	エストロートカプセル50			エストロートカプセル25			エストロート顆粒10%		
安定性比較試験									
相対比較試験									
長期保存試験									
経 時 変 化 試 験	加速試験								
	加温保存試験	25°・75%RH (B法)	缶 (閉)	EC52	25°・75%RH (B法)	PTP包装	EC24	25°・75%RH (B法)	PTP包装
		40° (2.4, 6箇月)			EC53	40° (2.4, 6箇月)			EG14
		50° (2.4, 6箇月)			EC54	50° (1.2, 3箇月)			EG15
加温・加湿保存試験	40°・75%RH (2.4, 6箇月)	褐色ガラス瓶 (閉)			40°・75%RH (2.4, 6箇月)			EG16	
	40°・90%RH (2.4, 6箇月)	褐色ガラス瓶 (閉)			40°・90%RH (2.4, 6箇月)				
光照射保存試験	けい光1000ルクス (1.2, 3箇月)	透明ガラス瓶 (開)			けい光1000ルクス (1.2, 3箇月)				
	直射日光 (10, 20, 30 日)	透明ガラス瓶 (開)			直射日光 (10, 20, 30 日)				
試験項目	(1)性状 (2)確認試験 (3)旋光度 (4)融点 (5)顆粒物質 (6)乾燥減量 (7)定量	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 赤外線吸収スペクトル	(1)性状 (2)確認試験 (3)顆粒物質 (4)崩壊試験 (5)定量	(1)性状 (2)確認試験 (3)崩壊試験 (4)定量 (5)定量	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 赤外線吸収スペクトル	(1)性状 (2)確認試験 (3)崩壊試験 (4)定量 (5)定量	1) 性状 (2)確認試験 (3)崩壊試験 (4)定量 (5)定量	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 液体クロマトグラフ法による確認 3) 崩壊試験 (4)定量 (5)定量	1) 性状 (2)確認試験 (3)崩壊試験 (4)定量 (5)定量
	強制分解試験	分解条件 ・固体状態での分解 ・高温・湿気・光 ・水浴液中での分解	試験項目 ・分解生成物の検出 ・分解生成物の構造確認 ・分解生成物の構造確認	測定法 ・pHプロファイル ・薄層クロマトグラフ法 ・赤外線吸収スペクトル	測定法 ・薄層クロマトグラフ法 ・液体クロマトグラフ法 ・赤外線吸収スペクトル				

I E-64 類縁体の開発

表 3(a) 生物学的同等性試験の試験方法

製 剤	エステートカプセル25 (EST 25mg含有カプセル, 大正製薬製造) エステートカプセル50 (EST 50mg含有カプセル, 大正製薬製造)
対 象	健康成人男子, 14名
投与方法	1群7名の2群に分け, EST 100 mgに相当する各製剤をそれぞれ空腹時1回経口投与。 第1回試験終了後, 1週間の休薬期間をおき, 製剤をクロスして第2回試験を実施。
採 血	投与前, 投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8時間
測定方法	ガスクロマトグラフ-質量分析法 (島津LKB9000型 GC/MS)

表 3(b) 生物学的同等試験の試験方法

製 剤	エステートカプセル50 (EST 50mg含有カプセル, 大正製薬製造) エステート顆粒10% (EST 10%含有顆粒, 大正製薬製造)
対 象	健康成人男子, 14名
投与方法	1群7名の2群に分け, EST 100 mgに相当する各製剤をそれぞれ空腹時1回経口投与。 第1回試験終了後, 1週間の休薬期間をおき, 製剤をクロスして第2回試験を実施。
採 血	投与前, 投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8時間
測定方法	ガスクロマトグラフ-質量分析法 (島津LKB9000型 GC/MS)

スポット量: 条件 A 50 μ l, 条件 B, C 25 μ l

検出方法: 条件 A, C ニンヒドリン, 条件 B 希硫酸

乾燥減量 (原体のみ):

日本薬局方一般試験法乾燥減量試験法に従い試験した。

崩壊試験 (製剤のみ):

日本薬局方一般試験法崩壊試験法に従い試験した。

定量法 (原体のみ):

試料約 0.8 g を精密に量り, 正確に 0.1 N 水酸化カリウム・エタノール液 50 ml を加えて溶かし, 10 分間放置後, 0.1 N 塩酸で滴定する。

(指示薬: フェノールフタレイン試液 3 滴)。同様の方法で空試験を行う。

定量法 (製剤のみ):

製剤を粉碎し, 製剤中の EST 量が 0.05 g に対応する量を精密に量り, 無水エタノール 30

ml を加え, 内標準溶液としてチモールの無水エタノール溶液 (7 \rightarrow 2000) 5 ml を正確に加えた後, 5 分間振り混ぜ, 無水エタノールを加えて正確に 50 ml とした。この液を毎分約 3000 回転で遠心分離し試料溶液とした。別に定量用 EST (純度 99.0 \sim 101.0%) を同じ濃度に溶かし標準溶液とした。液体クロマトグラフ法により試料溶液および標準溶液の内標準物質に対する EST のピーク面積比を求め, 含量を算出した。

[操作条件]

類縁物質 (液体クロマトグラフ法) の操作条件 1 と同様。

3. 生物学的同等性試験

エステートカプセル 25 とエステートカプセル 50 の生物学的同等性試験:

健康成人を対象とした血清中濃度比較試験 (クロスオーバー法) の試験方法を表 3(a) に示す。

1. EST の製剤化に関する研究

表 4 原体の長期保存試験結果

試験項目	保存期間	試験開始時			24箇月		
	ロットNo.	E-4	E-10	E-11	E-4	E-10	E-11
性状		(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
確認試験	カルボン酸エステルの確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	アミノ基の確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	赤外吸収スペクトルによる確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
	旋光度 (°)	+51.4	+52.3	+52.0	+52.0	+51.9	+51.4
	融点 (°)	126.3	125.5	124.7	125.7	125.1	124.6
類縁物質	液体クロマトグラフ法 (%)	1.0	0.4	0.8	1.2	0.4	1.0
	乾燥減量 (%)	0.06	0.08	0.08	0.07	0.06	0.08
	定量 (%)	99.4	99.7	99.6	100.3	100.0	100.0

(a) 白色の結晶性の粉末で、においはなかった。
 (b) 3292cm^{-1} , 2961cm^{-1} , 1755cm^{-1} , 1642cm^{-1} , 1555cm^{-1} 及び 899cm^{-1} 付近に吸収を認めた。

エステルカプセル 50 とエステル顆粒 10%の生物学的同等性試験：

健康成人を対象とした血清中濃度比較試験 (クロスオーバー法) の試験方法を表 3(b)に示す。

なお、血清中 E-64-c 濃度の定量は、宮原正³⁾らと同様に実施した。

結果および考察

1. 安定性試験

原体の長期保存試験 (B 法) の結果を表 4 に、苛酷経時変化試験の結果を表 5 に示す。

原体はいずれの保存条件においても変化が認められず、安定であった。したがって、通常の流通経路において長期間安定であると判断した。

エステルカプセル 50 とエステルカプセル 25 の安定性比較試験結果を表 6 に、カプセル剤における PTP 包装と缶包装の相対比較試験結果を表 7 に示す。

両製剤および両包装形態とも変化が認められず安定であった。したがって、両製剤間および両包装形態間の安定性は等しいと考え、エステルカプセル 50 の PTP 包装品を選択し、苛酷経時変化試験を実施した。

エステルカプセル 50 の長期保存試験 (B 法) の結果を表 8 に、苛酷経時変化試験の結果を表 9 に示す。

カプセル剤はいずれの保存条件においても変化が認められず、安定であった。したがって通常の流通経路において長期間安定であると判断した。

顆粒剤は、59 年夏より検討を開始したので 1 年 3 箇月の保存期間しか得られなかった。そこで、長期保存試験および苛酷経時変化試験に加え、加速試験を実施した。長期保存試験の結果を表 10 に、加速試験の結果を表 11 に、苛酷経時変化試験の結果を表 12 に示す。顆粒剤は $40^{\circ} \cdot 90\%RH$ の加温・加湿条件保存 4 箇月間で、わずかに外観の変化、分解生成物の増加および含量の低下が認められたが、他の条件では変化が認められず安定であった。したがって、通常の流通経路において長期間安定であると判断したが、長期保存試験の実施期間から有効期間 (1 年) を設定した。

2. 水溶液中での分解経路の推定

0.1 N 塩酸溶液、水溶液および希水酸化ナトリウム試液 (65°) 中で EST を分解し、液体クロマトグラム上における分解物ピーク面積の増減を経時的に測定した結果を図 1 に示す。

また、推定した分解経路を図 2 に示す。

EST は酸性およびアルカリ性において、速やかに E-64-c に分解し、さらにエポキシ環部分の開裂を生じた。中性では、E-64-c への移行が比較的緩やかで、一部はカルボン酸エステルの分解を伴わず、そのままエポキシ環部分の

表 5 原体の苛酷経時変化試験結果

試験項目	試験開始時			加温保存			加温・加湿保存			光照射保存							
	40°			50°			40°・75%RH			40°・90%RH							
	褐色ガラス瓶(閉)			褐色ガラス瓶(閉)			褐色ガラス瓶(閉)			透明ガラス瓶(開)							
	6箇月			6箇月			6箇月			3箇月							
保存条件 保存容器 保存期間	ロットNo.	E-4	E-10	E-11	E-4	E-10	E-11	E-4	E-10	E-11	E-4	E-10	E-11	E-4	E-10	E-11	
性状		(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
赤外吸収スペクトルによる確認		(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
旋光度 (°)		+51.2	+52.3	+52.0	+51.7	+51.2	+51.1	+51.6	+51.9	+51.7	+52.4	+51.9	+51.8	+51.9	+51.3	+52.1	+51.0
融点 (°)		126.3	125.5	124.7	126.0	125.2	124.8	125.9	125.0	124.5	125.3	124.4	125.5	124.5	124.5	125.0	124.6
類緑体物質	液体クロマトグラフ法 (%)	1.0	0.4	0.8	0.9	0.3	0.9	1.0	0.5	0.7	1.0	0.4	0.8	1.0	0.4	0.8	1.0
	薄層クロマトグラフ法	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)
乾燥減量 (%)	(A) ^{h)}	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)
	(B) ^{h)}	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)
定 量 (%)		0.06	0.08	0.08	0.13	0.05	0.06	0.15	0.06	0.06	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03
		99.4	99.7	99.6	99.2	99.2	98.2	100.1	99.8	98.9	97.5	100.0	99.7	98.4	99.6	98.4	99.5

(a) 白色の結晶性の粉末で、 3292cm^{-1} 、 2961cm^{-1} 、 1755cm^{-1} 、 1642cm^{-1} 、 1555cm^{-1} 、 899cm^{-1} 付近に吸収を認めた。
 (b) 分解物のスポットは認められなかった。
 (c) 分解物のスポットは認められなかった。
 注) (A)、(B)は操作条件を示す。

1. EST の製剤化に関する研究

表6 エステートカプセル 50 とエステートカプセル 25 の安定性比較試験結果

品名	保存条件・期間	試験開始時			40° - 2 箇月			50° - 2 箇月			65° - 1 箇月		
	ロットNo. 項目	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54
エステートカプセル 50	性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
	定量 (%)	99.4	99.4	102.2	96.4	97.2	97.0	97.4	96.6	100.0	96.0	95.6	97.8
	対直後 (%)	100	100	100	97.0	97.8	94.9	98.0	97.2	97.8	96.6	96.2	95.7
エステートカプセル 25	性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
	定量 (%)	98.0	97.6	100.4	97.2	98.0	99.2	99.6	94.8	98.4	94.4	94.0	96.0
	対直後 (%)	100	100	100	99.2	100.4	98.8	101.6	97.1	98.0	96.3	96.3	95.6

(a) キャップ部及びボディ部がともに白色不透明な硬カプセル剤である。その内容物は白色の粉末で、においはなかった。

表7 PTP 包装と缶包装の相対比較試験結果

試験項目	保存期間	試験開始時			6 箇 月					
	包装形態	—			PTP 包装			缶包装		
ロットNo.	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54	
性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	
液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	
崩壊試験 (分)	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-4	2-3	2-3	2-3	
定量 (%)	99.4	99.4	102.2	95.8	97.8	101.0	99.8	98.4	102.4	

- (a) キャップ部及びボディ部がともに白色不透明な硬カプセル剤である。その内容物は白色の粉末で、においはなかった。
 (b) 試料溶液における内標準物質チモールに対する EST の相対保持時間は標準溶液と等しかった。

表8 エステートカプセル 50 の長期保存試験結果

試験項目	保存期間	試験開始時			24 箇 月		
	ロットNo.	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54
性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
確認試験	カルボン酸エステルの確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	アミノ基の確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
崩壊試験 (分)	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	
定量 (%)	99.4	99.4	102.2	99.2	97.6	101.2	

- (a) キャップ部及びボディ部がともに白色不透明な硬カプセル剤である。その内容物は白色の粉末で、においはなかった。
 (b) 試料溶液における内標準物質チモールに対する EST の相対保持時間は標準溶液と等しかった。

表9 エステートカプセル50の苛酷経時変化試験結果

試験項目	保存条件		試験開始時						加温保存			加温・加湿保存			光照射保存							
	保存容器		40°		50°		40°・75%RH						けい光灯1000ルクス									
	保存期間		P T P 包装						P T P 包装						P T P 包装							
	ロットNo.		6 箇月		3 箇月		6 箇月		3 箇月		6 箇月		3 箇月		6 箇月		3 箇月		6 箇月		3 箇月	
性状	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	
	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
	0.7	0.7	0.7	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
薄層クロマトグラフ法	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)
	(A) ^(注)	(B) ^(注)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)
崩壊試験 (分)	2-3	2-3	2-3	2-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3
	99.4	99.4	102.2	95.6	96.8	99.0	94.8	96.2	99.6	95.8	97.8	101.0	97.8	98.8	100.0	97.8	98.8	100.0	98.4	98.2	98.2	101.4
定量 (%)																						

(a) キャップ部及びポディ部がともに白色不透明な硬カプセル剤である。その内容物は白色の粉末で、においはなかった。
 (b) 試験溶液における内標準物質チモールに対する E S T の相対保持時間は標準溶液と等しかった。
 (c) 分解物のスポットは認められなかった。
 (注) (A)、(B) は操作条件を示す。

1. EST の製剤化に関する研究

表10 エステート顆粒 10%の長期保存試験結果

試験項目	保存期間	試験開始時			15箇月		
	ロットNo.	EG11	EG12	EG13	EG11	EG12	EG13
性状		(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
確認試験	カルボン酸エステルの確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	アミノ基の確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
崩壊試験(分)		1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1
定量(%)		98.6	99.0	98.8	97.8	99.4	97.5

(a) 白色の顆粒で、においはなかった。
 (b) 試料溶液における内標準物質チモールに対するESTの相対保持時間は標準溶液と等しかった。

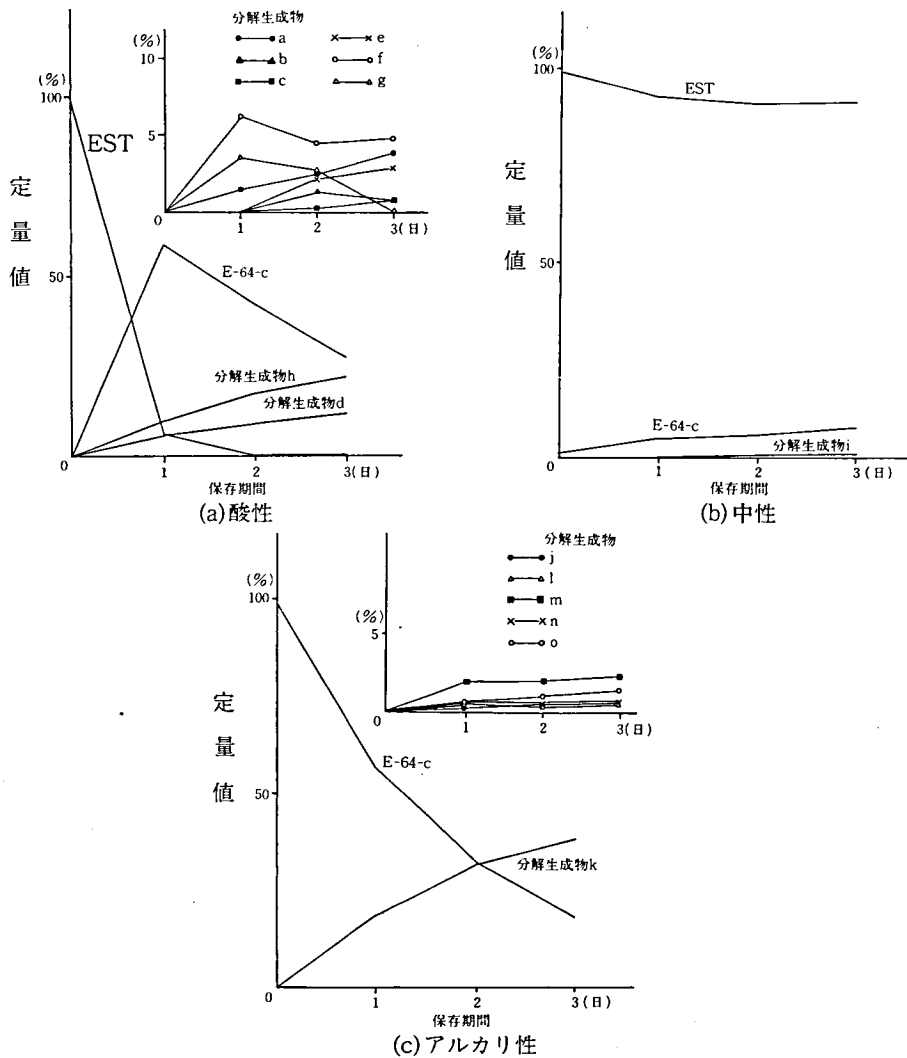


図1 水溶液中でのESTおよび分解生成物の挙動

I E-64 類縁体の開発

表11 エステート顆粒 10%の加速試験結果

試験項目	保存条件			室温			40°・75%RH			
	保存容器	試験開始時			缶(閉)					
	保存期間				6箇月			6箇月		
	ロットNo.	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16
性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
確認試験	カルボン酸のエステルの確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	アミノ基の確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
崩壊試験(分)	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1
定量(%)	99.0	100.6	101.3	96.3	98.5	100.7	96.2	97.4	97.8	

(a) 白色の顆粒で、においはなかった。
 (b) 試料溶液における内標準物質チモールに対するESTの相対保持時間は標準溶液と等しかった。

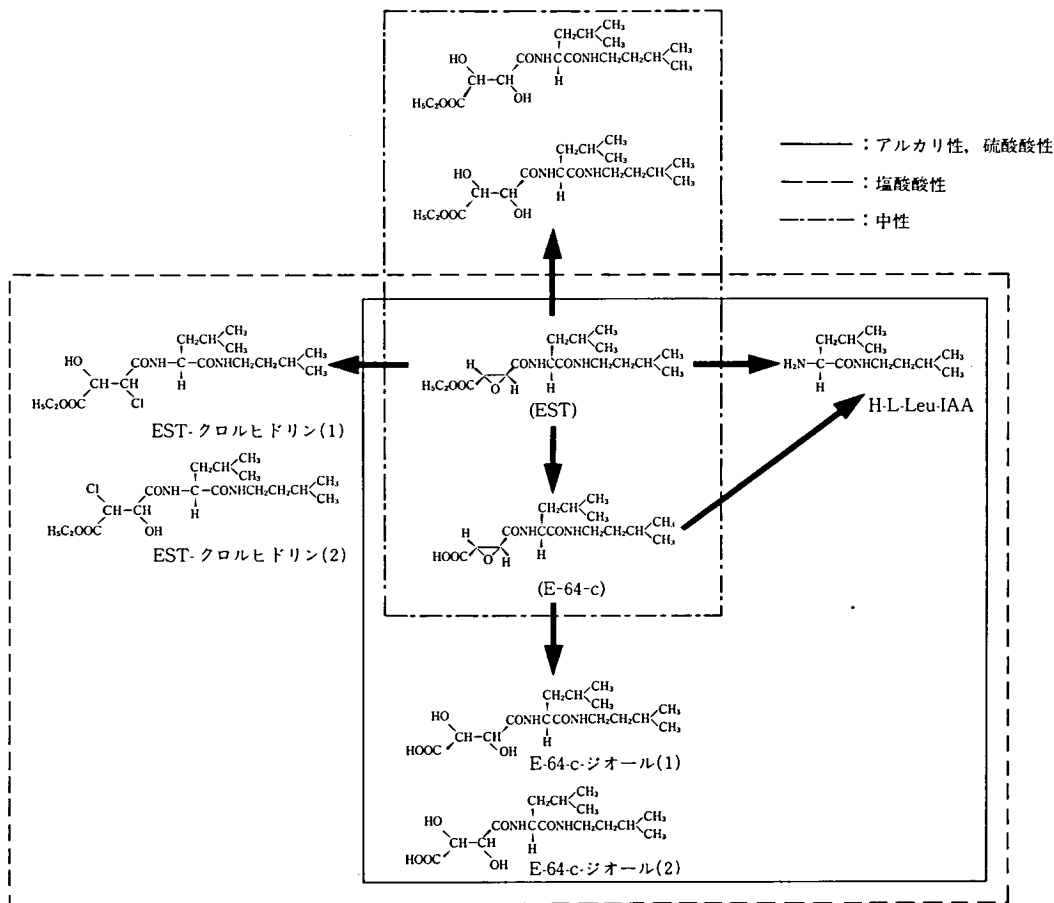


図2 水溶液中での推定分解経路

1. EST の製剤化に関する研究

表12 エステート顆粒10%の苛鹼経時試験結果

保存条件 保存容器 保存期間	加温保存			加温・加湿保存			光照射保存																
	40° (閉)			40°・75%RH			40°・90%RH			透明ガラス瓶 (開)													
	6 箇月	3 箇月	0 箇月	6 箇月	4 箇月	2 箇月	6 箇月	4 箇月	2 箇月	3 箇月	1 箇月	0 箇月											
試験開始時	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16											
性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(b)	(b)	(b)	(a)	(a)	(a)											
液体クロマトグラフ法による確認	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)											
液体クロマトグラフ法 (%)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.6	0.7	0.8	0.8											
薄層クロマトグラフ法 (A) ¹⁾	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)											
薄層クロマトグラフ法 (B) ²⁾	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)											
崩壊試験 (分)	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1											
定 量 (%)	99.0	100.6	101.3	98.8	99.8	98.4	96.8	98.2	98.8	95.1	98.4	98.2	95.7	98.0	97.5	94.4	97.0	96.9	96.8	98.3	98.8	98.8	100.7

(a) 白色の顆粒で、においはなかった。
 (b) 淡黄色に変化した。
 (c) 試験溶液における内標準物質をモールに対するESTの相対保持時間は標準溶液と等しかった。
 (d) 崩壊試験の結果は示されなかった。
 注) (A)(B) は操作条件を示す。

I E-64 類縁体の開発

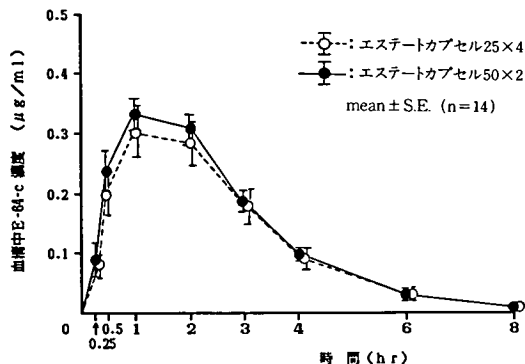


図3(a) 血清中 E-64-c 濃度推移

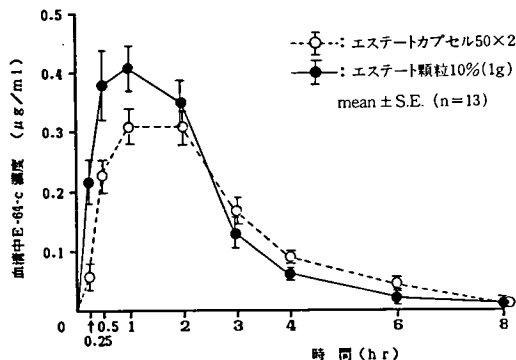


図3(b) 血清中 E-64-c 濃度推移

表13(a) 生物学的同等性試験結果
(エステルートカプセル 25 vs エステートカプセル 50)

(試験結果)

薬動学的パラメーター 製薬 (平均±S.E.)	AUC _{0-∞} (μg·hr/ml)	Cmax (μg/ml)	Tmax (hr)	T½ (hr)
エステルートカプセル25	0.99±0.08	0.36±0.03	2.00±0.28	1.19±0.18
エステルートカプセル50	1.06±0.07	0.38±0.03	1.43±0.14	1.03±0.07

(統計解析)

薬動学的パラメーター	項目	検出力 1-β	最小検出差 Δ (%)	BA差 (%)	信頼区間 (%)
AUC		0.54	27.2	7.07	-26.5~12.3
	Cmax	0.56	26.4	5.56	-24.4~13.3

AUC : 血清中濃度曲線下面積
Cmax : 最高血清中濃度
Tmax : 最高血清中濃度到達時間
T½ : 生物学的半減期

表13(b) 生物学的同等性試験結果
(エステルートカプセル 50 vs エステート顆粒 10%)

(試験結果)

薬動学的パラメーター 製薬 (平均±S.E.)	AUC _{0-∞} (μg·hr/ml)	Cmax (μg/ml)	Tmax (hr)	T½ (hr)
エステルートカプセル50	1.04±0.06	0.38±0.03	1.62±0.18	1.03±0.07
エステルート顆粒10%	1.11±0.11	0.44±0.05	1.23±0.22	0.96±0.10

(統計解析)

薬動学的パラメーター	項目	検出力 1-β	最小検出差 Δ (%)	BA差 (%)	信頼区間 (%)
AUC		0.74	21.5	6.7	-22.1~8.6
	Cmax	0.35	35.5	15.8	-44.2~9.6

AUC : 血清中濃度曲線下面積
Cmax : 最高血清中濃度
Tmax : 最高血清中濃度到達時間
T½ : 生物学的半減期

1. EST の製剤化に関する研究

開裂を生じた。

3. 生物学的同等性試験結果

試験製剤投与後の各測定時間における血清中 E-64-c 濃度推移を図 3(a)および(b)に、また薬動学的パラメータの平均値および統計解析結果を表 13(a), (b)に示す。

エステルカプセル 25 とエステルカプセル 50 投与後の血清中 E-64-c 濃度推移はきわめて類似しており、分散分析の結果からも有意差は認められなかった。また、エステルカプセル 50 とエステル顆粒 10%投与後の血清中 E-64-c 濃度推移もほぼ類似しており、分散分析の結果、有意差が認められなかった。

したがって、エステルカプセル 50、エステルカプセル 25 およびエステル顆粒

10%の 3 製剤は生物学的に同等であると判断した。

参考文献

- 1) 沢田二郎：EST 原体の規格及び試験方法の設定，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 58 年度研究報告書，13-18，1984.
- 2) 沢田二郎：E-64-d の物理的・化学的性質及び製剤化の検討，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 57 年度研究報告書，9-23，1983.
- 3) 宮原 正：E-64 の第 1 相臨床試験—第 1 段階—，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 57 年度研究報告書，147-155，1983.

2. EST 代謝物 (M-4-b) の合成検討

大 関 正 弘*

研究協力者 横 尾 千 尋* 村 田 充 男*
渡 辺 慶 昭* 曾 田 馨*

目 的

EST の代謝物の一つとして M-4-b が見出されている。M-4-b は、EST のイソアミルアミド側鎖の末端メチル基の片方が酸化されたものと推定されている。本酸化反応により新たに生成した不斉炭素の絶対配置は、今のところ不明である。今回我々は、M-4-b の立体化学を含めた構造の確認を目的として、予想される二種類のジアステレオマー、11a および 11b の合成を検討した。

方 法

11a および 11b は、各々光学活性な、3-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸メチル (1a, 1b) を出発原料として、図 1 に示す製法に従って合成を検討した。

結 果

森らの方法^{1,2)}に準拠し、(S)-(+)-3-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸メチル (1a) より 3 工程で 4a を得た後、シアン化ナトリウムを用いてシアノ体 (5a) とした (収率：96%)。次に、5a をリチウムアルミニウムヒドライド (LAH) で還元し、重要な中間体である光学活性な (R)-4-ヒドロキシイソアミルアミン誘導体 (6a) を得た。6a は精製することなく、Z-L-ロイシンと縮合し 7a とした (収率：2 工

程 91%)。次いで 7a の Z 基 (ベンジルオキシカルボニル基) を、CTH 法 (Catalytic Transfer Hydrogenation)³⁾ を用いて除去した後、L-トランス-エポキシコハク酸メチルパラニトロフェニルエステルと縮合し、9a に導き、(収率：2 工程 77%) 更に、パラトルエンスルホン酸で THP 基 (テトラヒドロピラニル基) を除去することにより、目的とする 11a のメチルエステル体 (10a) を得た (収率：79%)。また、上記と同様の方法により、1b より 10b を得た。

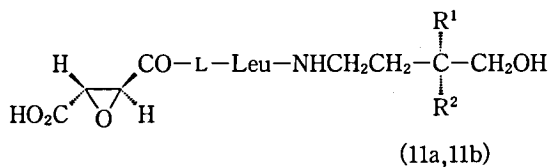
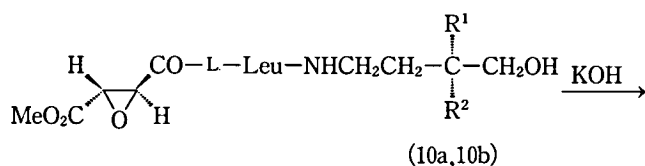
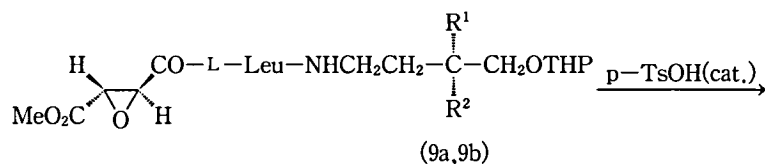
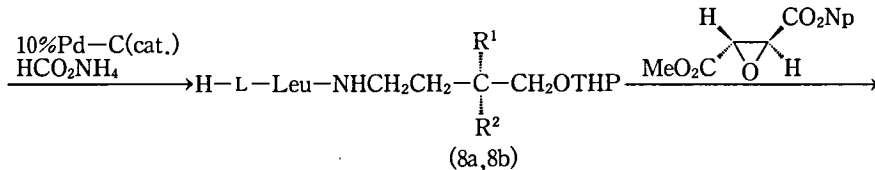
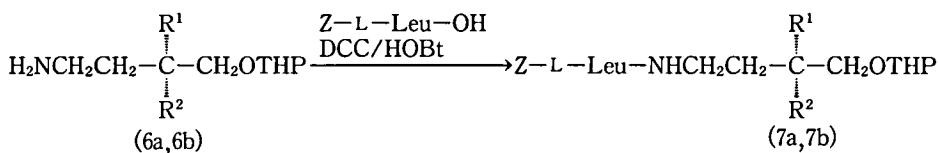
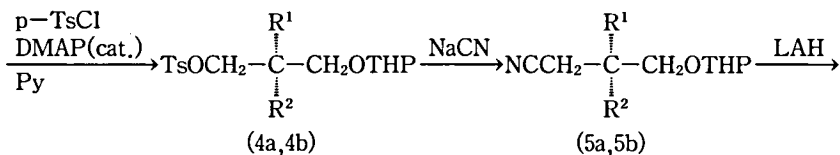
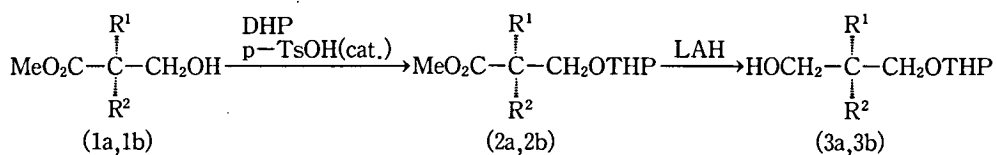
現在、目的とする 11a および 11b を得るため、10a および 10b の加水分解を検討中である。

結 論

今回、EST の代謝物である M-4-b のメチルエステル体と推定される 2 種類のジアステレオマー、10a および 10b の立体選択的な合成に成功した。また、得られた 10a および 10b は、生体由来の M-4-b メチルエステル体の同定に用いた。

今後、最終目的物の 11a および 11b を合成する。

* 大正製薬株式会社総合研究所



a: R¹=Me, R²=H b: R¹=H, R²=Me

図1 EST代謝物(M-4-b)の合成法

2. EST 代謝物 (M-4-b) の合成検討

文 献

- 1) Mori, K. and Senda, S.: Synthesis of the enantiomers of *cis*-2-methyl-5-hexanolide, the major component of the sex pheromone of the carpenter bee, *Tetrahedron*, **41**, 541, 1985.
- 2) Mori, K.: Revision of the absolute configuration of A-factor, *Tetrahedron*, **39**, 3107, 1985.
- 3) Johnstone, R. A. W. and Wilby, A. H.: Heterogeneous Catalytic Transfer Hydrogenation and Its Relation to Other Methods for Reduction of Organic Compounds, *Chem. Rev.*, **85**, 129, 1985.

