

## 【概要】

GMP製造を行うに当たり、岐阜大学から開示されたP092・2 マレイン酸塩の規格及び試験方法の見直しを行った。

① エンドトキシン試験	追加
② 微生物試験	追加
③ 残留溶媒	追加
④ 溶状 規格および試験方法	変更
⑤ 類縁物質の規格	変更
⑥ pH の試験方法	変更
⑦ 性状の規格	変更
⑧ NMR	削除
⑨ X線回析	削除
⑩ HPLCによる定量	削除

とした。

以上の結果を「物理的・化学的性質ならびに規格及び試験法に関する資料」としてまとめ、岐阜大学に提出するとともに岐阜大学の指示でPOCクリニカルリサーチ株式会社に提出した。

## 1. 開示された規格及び試験方法

岐阜大学から開示された規格及び試験方法を別紙-1、-2に示した。GMP製造にあたり、危惧された課題を表-1にまとめた。これらについて検討を実施した。

表 1: 試験規格、方法課題まとめ

項目		課題	対応
物理的・化学的性質		東京化成で行った安定性試験時の溶解性試験で規格を外れた	規格見直し
確認試験	NMR	IRと重複	試験から除外
PH		東京化成で行った安定性試験時の試験では、懸濁状態で測定	試験方法見直し
純度試験	溶状	不溶物の確認ができない	試験方法見直し
	類縁物質	ICHの不純物ガイドラインとの相違	規格見直し
	残留溶媒	規格、試験方法なし	規格、試験方法設定
	エンドトキシン	規格、試験方法なし	規格、試験方法設定
定量		HPLCと非水滴定重複	見直し
微生物試験		規格、試験方法なし	規格、試験方法設定
X線回析		結晶多形存在せず	試験から除外

## 2. 規格、試験方法検討

### 2-1. 物理的・化学的試験(溶解性)

日本薬局方の通則に記載されている溶解性を示す用語を表-2に示した。

用語	溶質1g又は1mLを溶かすのに要する溶媒量	
極めて溶けやすい	1mL未満	
溶けやすい	1mL以上	10mL未満
やや溶けやすい	10mL以上	30mL未満
やや溶けにくい	30mL以上	100mL未満
溶けにくい	100mL以上	1000mL未満
極めて溶けにくい	1000mL以上	10000mL未満
ほとんど溶けない	10000mL以上	

開示されたP092・2マレイン酸塩の溶解性は「メタノールに溶けやすく、水およびエタノールにやや溶けにくい」であった。一方で、長期安定性試験で溶解性評価を行ったところ、溶解性が異なることが指摘されている。このため、日局方に準じた試験方法で、溶解性を評価した。

#### 2-1-1. 方法

評価方法は、日局方の試験方法に準じて行った。すなわち、P092・2マレイン酸塩を①1g(1g/10mL未満相当)、②333mg(1g/30mL未満相当)、③100mg(1g/100mL未満相当)、④10mg(1g/1000mL相当)、⑤1mg(1g/10000mL相当)量りとり、メタノール、水、エタノール(99.5%)、それぞれの溶媒を10mL加え(①は5mL)、20℃±5℃で5分ごとに強く30秒振り混ぜ、30分後の溶状を目視で確認した。

## 2-1-2. 結果

それぞれの溶媒で行った結果を表-2,-3,-4 及び図-1、-2、-3 に示した。

表 2:メタノール溶媒での溶解性確認結果

サンプル	結果	用語
①	不溶	溶けやすい
②	溶解	やや溶けやすい
③	溶解	やや溶けにくい
④	溶解	溶けにくい
⑤	溶解	極めて溶けにくい

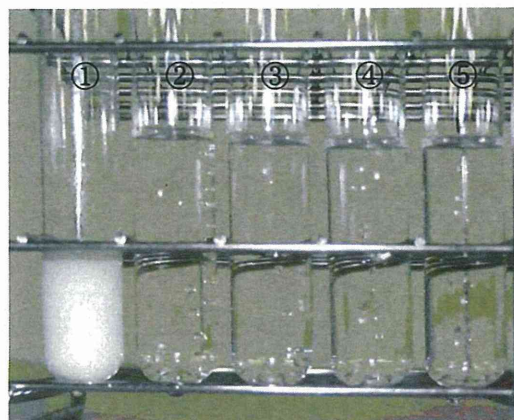


図 1: メタノール溶媒での溶解性確認結果

表 3:エタノール溶媒(99.5%)での溶解性確認結果

サンプル	結果	用語
①	不溶	溶けやすい
②	不溶	やや溶けやすい
③	不溶	やや溶けにくい
④	溶解	溶けにくい
⑤	溶解	極めて溶けにくい

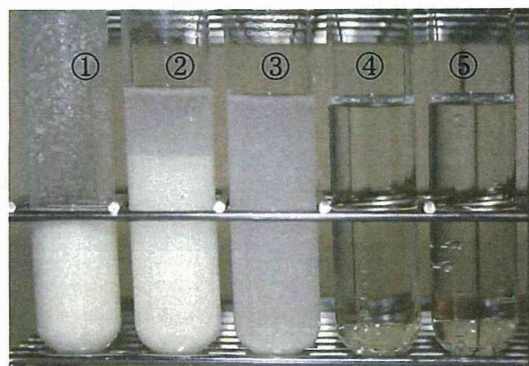


図 2: エタノール溶媒 (99.5%) での溶解性確認結果

表 4:水での溶解性確認結果

サンプル	結果	用語
①	不溶	溶けやすい
②	不溶	やや溶けやすい
③	不溶	やや溶けにくい
④	溶解	溶けにくい
⑤	溶解	極めて溶けにくい

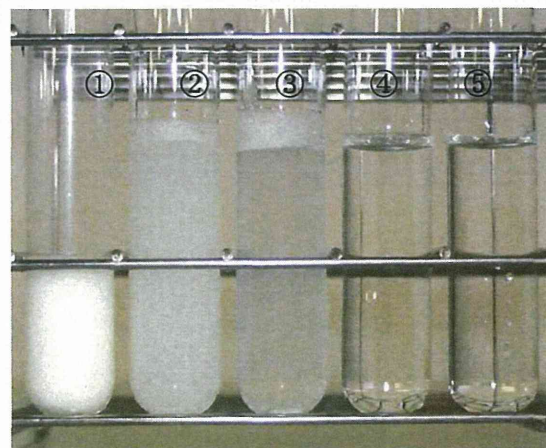


図 3: 水での溶解性確認結果

以上の結果から、P092・マレイン酸塩の溶解性については、「メタノールにやや溶けやすく、水及びエタノール(99.5%)」に溶けにくいとした。

## 2-2. pH

開示された pH の試験方法では、「本品 1g を、煮沸し冷却した水 100mL に溶かした液の pH は 3.5 ~5.0」とあるが、この条件で試料溶液を調製したところ、液は白濁状態であった。不溶物を遠心回収し、HPLC で分析した結果、不溶物は P092・2 マレイン酸塩であることが確認できた。不溶物が存在する状態では正確な pH が測れていない可能性があるため、加温溶解して pH を測定した。その結果、わずかではあるが pH が上昇した。このため、pH の測定は、加温溶解後、試料溶液を 25℃ 付近まで冷却して測定する方法に変更した。

表 5: pH 測定 加温の有無による pH 比較

	加温なし	加温あり
試料1(Lot25PF-QJ)	pH3.99	pH4.03
試料2(LotKS14001)	pH3.99	pH4.03

測定温度: 25±3℃



図 4: 加温なし



図 5: 加温あり

### 2-3. 溶状

開示された溶状の試験方法では「本品 1g を熱水 20mL に溶解するとき、溶液は、無色わずかな微濁」とある。濁りが判定や不溶物の確認の妨げになる可能性があるため、温度による溶解状態を確認した。その結果、70℃に加温することで、溶液が澄明になることが確認できた。

一方、溶液の色については、nonGMP 製造時にわずかながら結晶の着色(黄色)が認められ、溶状も微黄色となった。P092・2 マレイン酸塩の結晶着色については、先行で行われている安定性試験において、経時的に認められることから、現時点では「無色澄明」から「無色又は微黄色澄明」とすることが妥当だと判断した。

従って、溶状については、「本品 1g に水 20mL を加え、70℃で加温溶解するとき、液は無色又は微黄色澄明」と変更した。なお、溶状の規格変更に伴い、性状(結晶の色)も「白色の結晶性粉末」から「白色から微黄色の結晶性粉末」に変更した。



図 4：P092・2 マレイン酸塩 加温温度と溶解状態

表 6：P092・2 マレイン酸塩 加温温度と溶解状態

温度	40℃	50℃	60℃	70℃
濁りの有無	+	+	±	-

### 2-5. 類縁物質

開示された類縁物質の規格は、HPLC area1%以下であったが、「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」(日米EU医薬品規制調和国際会議:ICH)に照らし合わせて、最大類縁物質 0.15%以下、類縁物質 1%以下と変更した。

## 2-6. 残留溶媒

開示された規格及び試験方法には、残留溶媒の項目が無い。このため、「医薬品の残留溶媒ガイドライン」(平成 10 年 3 月 30 日 医薬審第 307 号)に基づき新たに残留溶媒の規格を設定した(表-7)。

表 7: 残留溶媒規格

対象溶媒	規格値
エタノール	5000ppm 以下
テトラヒドロフラン(THF)	720ppm 以下
トルエン	890ppm 以下
ジクロロメタン	600ppm 以下
シクロペンチルメチルエーテル(CPME)	5000ppm 以下
酢酸エチル	5000ppm 以下
イソプロピルエーテル(IPE)	5000ppm 以下

これらの溶媒を測定する方法として、ガスクロマトグラフィーでの測定方法を検討した。

### 2-6-1. 方法

P092・2 マレイン酸塩 LotKS14001 0.5g を 5ml メスフラスコにとり、残留溶媒試験用 DMF で溶解し、メスアップし試料溶液とした。試料溶液 1  $\mu$ L を正確にガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラフのピーク面積を測定した。

#### 分析条件

装置: ヘッドスペースガスクロマトグラフィー(シマス GC-2010, TurboMatrix40)

カラム: Fused Silica,  $\phi$  0.32  $\times$  60m, 6% cyanopropylphenyl and 94% methylpolsiloxane

オープン温度: 100 $^{\circ}$ C ニードル温度: 110 $^{\circ}$ C トランスファー温度: 120 $^{\circ}$ C

HS キャリアガス圧力: 270kPa

試料気化室 (HSSPL)

注入モード: スプリット 気化室温度: 200 $^{\circ}$ C キャリアガス: He

カラム流量: 2.5mL/min 線速度: 32.1cm/sec ページ流量: 3.0mL/min

カラムオープン

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C 平衡時間: 2.0min

カラム温度プログラム: 40 $^{\circ}$ C で 5 分間その後 12 $^{\circ}$ C/min で 100 $^{\circ}$ C まで昇温

100 $^{\circ}$ C で 0.1 分間その後、35 $^{\circ}$ C/min で 250 $^{\circ}$ C 昇温 250 $^{\circ}$ C で 6 分間保持する  
(合計時間 20.39min)

検出器

検出器温度: 260 $^{\circ}$ C メイクアップガス: N<sub>2</sub>/Air

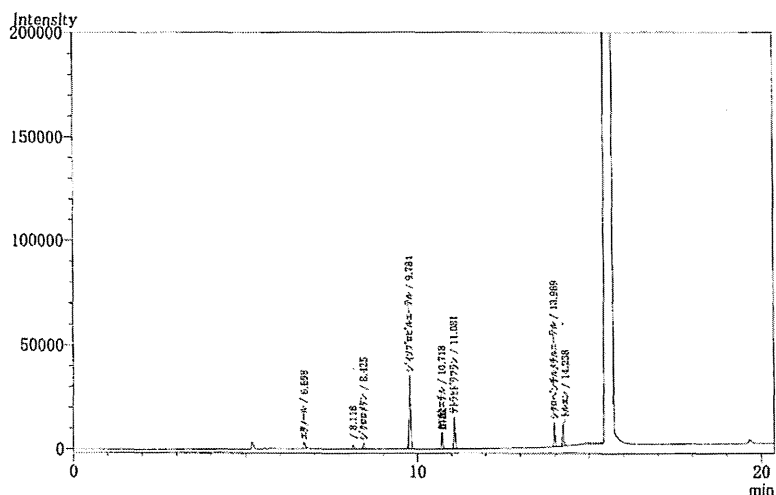
メイクアップ流量: 45mL/min

H<sub>2</sub> 流量: 40mL/min Air 流量: 400mL/min

## 2-6-2. 結果

ガスクロマトグラフィー測定の結果、目的とする溶媒の分離もよく、残留溶媒が測定できることが確認できた(図-7,-8)。したがって、GCによる残留溶媒の測定方法を試験項目に追加した。

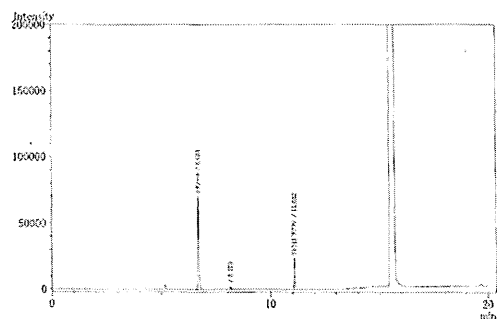
サンプルID : 検出確認(100ppm相当)  
 サンプルタイプ : 未知  
 注入量 : 0.05  
 内標量 :  
 データファイル : C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\FP092・2マレイン酸塩\F141211\F008  
 メソッドファイル : C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\FP092・2マレイン酸塩\F141211\F141



ピーク番号	保持時間	面積	高さ	マーク	ID#	化合物名
1	✓ 6.698	✓ 11073	2801		1	エタノール
2	✓ 8.118	✓ 5853	1691			
3	✓ 8.425	✓ 8284	2631		4	シクロメタン
4	✓ 9.784	✓ 120913	34367		7	ジイソプロピルエーテル
5	✓ 10.718	✓ 20642	7672		6	酢酸エチル
6	✓ 11.081	✓ 41086	14747		2	テトラヒドフラン
7	✓ 13.989	✓ 30596	11579		5	シクロペンチルメチルエー
8	✓ 14.238	✓ 26229	9973		3	トルエン
合計		264676	85461			

図 5 : 各溶媒 100ppm 相当の GC チャート

分析日時 : 2014/12/11 23:27:48  
 分析者 : ssm33344  
 ベット番号 : 10  
 サンプル名 : F092・2マレイン酸塩  
 サンプルID : No.KS14001 n=1  
 サンプルタイプ : 未知  
 注入量 : 0.05  
 内標量 :  
 データファイル : C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\FP092・2マレイン酸塩\F141211\F010  
 メソッドファイル : C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\FP092・2マレイン酸塩\F141211\F141



ピーク番号	保持時間	面積	高さ	マーク	ID#	化合物名
1	6.681	215231	69376		1	エタノール
2	8.120	6570	1591			
3	11.932	66850	20553		2	テトラヒドフラン
合計		316791	91870			

図 6 : LotKS14001 の GC チャート

## 2-7. エンドトキシン

本品は、投与経路を静脈とする注射剤であることから、エンドトキシン濃度を規定する必要がある。まず、規格値についての考察を行った。P092 は静脈内注射であることから、投与経路による規定量(表-8)より、kg 当たりの規定量は 5EU(K 値)となる。投与量は、現在 10mg/kg(M 値)であることから、P092・2 マレイン酸塩の規格値は  $5\text{EU}/10\text{mg}=0.5\text{EU}/\text{mg}$  となる。この数値を規格値とした。

次に、この規格値のエンドトキシンが測定可能か検討を行った。

### 2-7-1. 方法

比濁法を用いて反応干渉因子試験を行ったところ、検体の 40 倍希釈で測定可能であることが確認できた(表-9)。

弊社で調製した P092・2 マレイン酸塩(Lot20141008)に含まれるエンドトキシンは規格内(0.5EU/mg 以下)であった。

表 8: 投与経路によるエンドトキシン規定値

投与経路	K(EU/kg)
静脈	5
静脈(放射性医薬品)	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5

表 9: 比濁法による干渉因子試験結果

希釈倍率	サンプル濃度	試験結果	回収率 (%)	判定
2 倍	5mg/mL	0.457EU/mg	1738	不適
4 倍	2.5mg/mL	0.048EU/mg	133	不適
20 倍	0.5mg/mL	0.010EU/mg	34	不適
40 倍	0.25mg/mL	0.020EU/mg	90	適
200 倍	0.05mg/mL	0.101EU/mg	8	不適

回収率 50~200%の範囲⇒測定可能

以上の結果から、P092・2 マレイン酸塩中のエンドトキシンは測定可能と判断し、試験規格項目に追加した。

## 2-8. 微生物試験

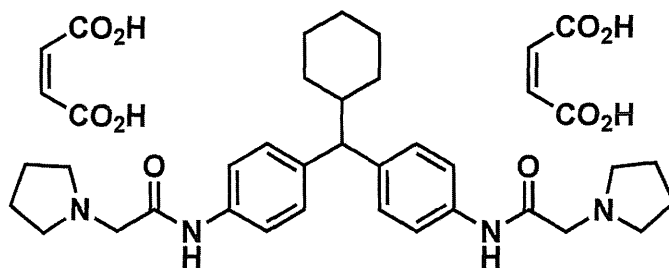
弊社で通常行っている微生物試験方法で微生物試験が可能であることを確認し、試験項目として追加した。

以上の検討内容を踏まえ、別紙に示した「物理的・化学的性質ならびに規格及び試験法に関する資料」に試験方法及び規格をまとめた。



1. 物理的・化学的性質ならびに規格及び試験法に関する資料  
(積水メディカル株式会社)

1. P092・2 マレイン酸塩



化学名 : N,N'-[(Cyclohexylmethylene)di-4,1-phenylene]bis[2-(1-pyrrolidinyl)acetamide]Dimalate

示性式 :  $C_{31}H_{42}N_4O_2 \cdot 2C_4H_4O_4$

分子量 : 734.84

物理的及び化学的性質 : 本品は、白色から微黄色の粉末である。メタノールにやや溶けやすく、水及びエタノール(99.5%)に溶けにくい。

本品を乾燥したものは定量するとき、P092・2 マレイン酸塩( $C_{31}H_{42}N_4O_2 \cdot 2C_4H_4O_4$ )98~102%を含む。

2. 原薬の規格および試験方法

本試験方法は、別に規定するもののほか、日本薬局方一般試験法を準用するものとする。

2-1. 性状

本品は、白色から微黄色の結晶性の粉末である。

本品は、メタノールにやや溶けやすく、水及びエタノール(99.5)に溶けにくい。

本品は、吸湿性が強い。

2-2. 確認試験

(1) 本品を乾燥し、赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法による試験を行い、本品のスペクトルと本品の参照スペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。

(2) 本品 0.10g をメタノール 3mL に溶かし、試料溶液とする。マレイン酸 105.3mg に水 5mL を加えて溶かし、さらに水で正確に 10mL とし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液 5 $\mu$ L ずつを、薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板の原点にスポットする。次にジエチルエーテル/メタノール/酢酸(100)/水混液(70:20:7:3)を展開溶媒として約 12cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線(主波長 254nm)を照射するとき、試料溶液から得た 2 個のスポットのうち 1 個のスポットは標準溶液から得たスポットと同程度の濃さであり、それらの Rf 値は等しい。

2-3. pH

本品 1.0g に水 100mL を加えて、70°C の温水中で溶かした後、室温まで冷却した液の pH は 3.5~5.0 である。

## 2-4. 純度試験

### (1) 溶状

本品 1.0g に水 20mL を加え、70℃の温水中で溶かすとき、液は無色から微黄色澄明である。

### (2) 塩化物

本品 1.0g に水 30mL 及び希硝酸 6mL を加えて溶かし、水を加えて 50mL とする。これを検液とし、試験を行う。比較液は、0.01mol/L 塩酸 0.28mL に希硝酸 6mL 及び水を加えて 50mL とする(0.01%以下)。

### (3) 重金属

本品 1.0g をとり、第 3 法により操作し、試験を行う。比較液には、鉛標準液 2.0mL を加える(20ppm 以下)。

### (4) 砒素

本品 1.0g をとり、第 3 法により検液を調製し、試験を行う(2ppm 以下)。

### (5) 類縁物質

本品 0.01g を精密に量り、試料溶解液を加えて正確に 10mL とし、試料溶液とする。この液 1mL を正確に量り、試料溶解液を加えて正確に 100mL とする。この液 2mL を正確に量り試料溶解液を加えて正確に 20mL とし、標準溶液とする。試料溶液、標準溶液、ブランク溶液(試料溶解液)につき 5 $\mu$ L ずつを正確にとり、次の HPLC 条件で液体クロマトグラフィー法により試験を行う。試料溶液のピーク面積を自動積分法により類縁物質を算出する。ただしブランク溶液から得られたピーク並びに P092 のピークを除外し、それ以外の各々のピークの面積を算出するとき、各々のピーク面積は 0.15% 以下であり、また、類縁物質の合計は 1% 以下である。

#### 【HPLC条件】

検出器:紫外吸光光度計(測定波長:254nm)

カラム:GLサイエンス Inertsil ODS-2 (φ4.6mm×250mm、5 $\mu$ m)又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度:40℃付近の一定温度

移動相A:水 1000mL にトリフルオロ酢酸 2mL を加える。

移動相B:アセトニトリル 1000mL にトリフルオロ酢酸 2mL を加える。

移動相条件:移動相A:移動相Bを 80:20 から開始し、20 分の直線グラジエント法で 40:60 にし、その後 30 分間保つ。

流量:1.0mL/min(P092 の保持時間は 14~17 分)

面積測定範囲:約 4 分から 50 分(マレイン酸のピークは除外)

試料溶解液:移動相A/移動相Bの混合液(1:1)

#### システム適合性

再現性の確認:標準溶液を6回繰返し測定における相対標準偏差は 2% 以下。また、標準溶液の P092 ピークの理論段数及びシンメトリー係数は 2000 段以上及び 2.0 以下である。

### (6) 残留溶媒

本品 0.5g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 5mL とし試料溶液とする。

#### 標準溶液の調製

エタノール、テトラヒドロフラン、トルエン、ジクロロメタン、シクロペンチルメチルエーテル、酢酸エチル、ジイソプロピルエーテルの基準物質を約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする。(1000ppm 相当)

試料溶液及び標準溶液につき次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行い、各々の溶媒のピーク面積より次の式により溶媒量を求めるとき、エタノールは 5000ppm 以下、テトラヒドロフラン 720ppm 以下、トルエン 890ppm 以下、ジクロロメタン 600ppm 以下、シクロペンチルメチルエーテル 5000ppm 以下、酢酸エチル 5000ppm 以下、ジイソプロピルエーテル 5000ppm 以下である。

## 【分析条件】

装置:ヘッドスペースガスクロマトグラフィー(シマス GC-2010、TurboMatrix40)  
カラム:Fused Silica,  $\phi$  0.32×60m,6%cyanopropylphenyl and94%methylpolysiloxane  
例:DB-624(J&W)又は同等品

オートサンブラ (Turbo Matrix HS)

ヘッドスペースモード:コンスタント 注入モード:時間 注入時間:0.05min  
オープン温度:100℃ ニードル温度:110℃ トランスファー温度:120℃  
バイアルベンディング:ON 保持時間:30min 加圧時間:0.5min  
引き抜き時間:0.5min GC サイクル時間:36min  
HS キャリアガス圧力:270kPa

試料気化室 (HSSPL)

注入モード:スプリット 気化室温度:200℃ キャリアガス:He  
制御モード:圧力 圧力:131.6kPa 全流量:10.5mL/min  
カラム流量:2.5mL/min 線速度:32.1cm/sec ページ流量:3.0mL/min  
スプリット比:2.0 高圧注入:OFF キャリアガスセーブ:OFF  
スプリット比保持:OFF

カラムオープン

カラム温度:40℃ 平衡時間:2.0min  
カラム温度プログラム:40℃で5分間その後12℃/minで100℃まで昇温  
100℃で0.1分間.その後,35℃/minで250℃まで昇温,250℃で6分間保持する.  
(合計時間20.39min)

検出器

検出器温度:260℃ メイクアップガス:N<sub>2</sub>/Air  
メイクアップ流量:45mL/min  
H<sub>2</sub> 流量:40mL/min Air流量:400mL/min

残留溶媒 (ppm) = 各基準物質の量 (g) × At/As × 1/Wt × 1/a × 1000000

At: 試料溶液の溶媒ピーク面積  
As: 標準溶液の各溶媒ピークの面積  
Wt: 本品の秤量値  
a: 標準溶液の希釈倍率 (100)  
1000000: ppm への換算係数

システム適合性

再現性の確認

標準溶液を6回繰返し測定における各ピーク面積の相対標準偏差は5%以下.

検出の確認

標準溶液 1mL 正確にとり, ジメチルホルムアミドを加えて正確に 10mLとし, 検出確認溶液し測定するとき各ピークを認める.

(7) エンドトキシン

本品 0.1g をとり, エンドトキシン試験用水約 10mL を加え, 70℃温浴槽で加温して溶かす. この液 0.1mL をとり, エンドトキシン試験用水で全量 4mL としたものを試料溶液とし, ライセート試薬を用い, ゲル化法によって試験を行う. (エンドトキシン 0.5EU/mg 以下).

2-5. 水分

本品約 0.1g を精密に量り、水分測定法(カールフィッシャー法)により試験を行う。(10%以下)。

2-6. 強熱残分

0.1%以下(1.0g)。

2-7. 定量法

本品を乾燥し、その約 0.5g を精密に量り、酢酸(100)25mL を正確に加えて溶かした後、アセトニトリル 25mL を正確に加えてよくかき混ぜる。この試料を用いて 0.1mol 過塩素酸/酢酸溶液で電位差滴定を行う。同様の方法で空試験を行い補正する。

0.1mol/L 過塩素酸 1mL=36.742mg  $C_3H_4N_4O_2 \cdot 2C_4H_4O_4$

2-8. 微生物試験

(1)細菌数

微生物限度試験法で試験を行う。ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を用い、35～40℃で3～5日間培養する。(50個以下/g)。

(2)真菌数

微生物限度試験法で試験を行う。サブロー・ブドウ糖カンテン培地を用い、20～25℃で5～7日間培養する。(10個以下/g)。

(3)大腸菌

微生物限度試験法により試験を行う。(陰性)。

P092・2 マレイン酸塩

#### 4. GMP 製造結果報告

## 【概要】

nonGMP 製造を実施した結果、小スケールと同等の品質、収量が得られたことから、作業標準書並びに製造ロット指図記録書を作成し、GMP 製造(300g×2 バッチ)を実施した。その結果、以下の表に示す結果であった。

製造ロット番号	収量	総収率	純度	製品ロット番号
15001	519.2g	32.3%	99.9%	001WCM
15002	518.4g	31.7%	99.8%	002WCM

なお、製造ロット番号は小分け包装を行った後、製品ロット番号に変更になります。

これらのロットについては、それぞれ 100g×3 本(300g)を小分け包装し、製品化した。安定性評価サンプルとして 4g×22 本、5g×4 本、1g×4 本を準備した。

# 1. GMP 製造

シクロヘキサンカルボキシアルデヒド 250g スケールで、nonGMP を実施した結果、小スケールとほぼ同等の品質が得られたことから、別紙のように作業標準書および製造ロット指図記録書を作成し P092・2 マレイン酸塩 300g×2 ロットの GMP の製造を実施した。

## 1-1. Lot15001

### ①第一工程

シクロヘキシルカルボキシアルデヒド(以下 CCA)250g にアニリン 824g と濃塩酸(conc.36%)23g を添加して、窒素置換後、80℃に昇温してアニリン付加反応を行い、シクロヘキシルメチレンジアニリン(以下 CDA)反応液を得た。反応後、5%水酸化ナトリウム溶液 9.3g とジエチレングリコール 1020g を添加し、減圧蒸留でアニリンを留去した。留去後、2N 塩酸溶液とトルエンを添加しアニリン留去物を溶解し、5%水酸化ナトリウムで pH を 1 に調整した後、水層を分液した。さらに 2 回トルエン添加、分液を繰り返した後、水層を 5%水酸化ナトリウム溶液で pH3 に調整し、分液した。水層にトルエンを加え、分液・洗浄をする操作をさらに 4 回行った後、トルエン洗浄した水層に活性炭を添加し、室温で 30 分攪拌し、濾過により活性炭を除き、活性炭処理液を得た。pH12 にコントロールしながら活性炭処理液と 5%水酸化ナトリウム溶液を添加し中和晶析を行った。析出した結晶を濾取して、45℃で減圧乾燥後 CDA370.4g を得た。

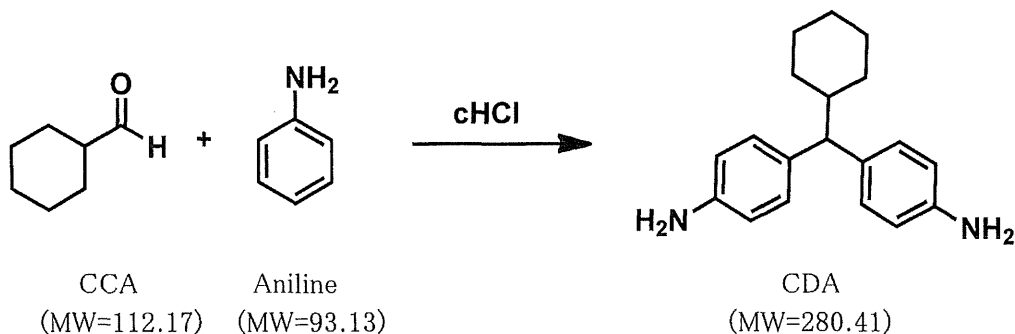


図1: 第一工程合成ルート

予め設定した管理項目を表-1 に結果のまとめを表-2 に示す。

表 1: 第一工程 管理項目結果まとめ

項目	基準	nonGMP KS14001	GMP 15001
反応温度	75~85℃	78.2~79.7℃	75℃~81.1℃
反応時間	18~24hr	22hr	23hr
冷却温度	50℃以下	44.1℃	49.1℃
留去温度	60~140℃	135℃	140℃
アニリン残存	HPLC エリア 0.1%以下	0.02%	0.03%,0.05%
pH 調整	0.8~1.2	1.06	1.05
内温	30℃以下	22.8℃	23.5℃
pH 調整	2.8~3.2	3.1	3.1
内温	30℃以下	20.5℃	22.1℃
晶析後 pH	10.0~12.5	11.24	11.03
攪拌時間	1hr 以上	1hr	1hr
攪拌時間	1hr 以上	1hr	1hr
水分	1.2%以下	0.5%	0.3%

表-1に示したように、予め設定した管理項目については、すべて基準内であった。

表 2: 第一工程結果まとめ

項目	東京化成 LotFA5QJ	25g 実験	100g 実験	Non-GMP LotKS14001	GMP Lot15001
仕込み原料	350g	25g	100g	250g	250g
反応温度、時間	140℃、5hr	80℃、終夜	80℃、20hr	80℃、21.5hr	80℃、23hr
収量	426g	38.98g	151.9g	388.2g	370g
収率	48.7%	62.4%	61.3%	62.1%	59.2%
HPLC 純度	—	64.70%	78.2%	84.7%	84.9%
晶析状態	—	良好	良好	良好	良好

表-2 に示したように Lot15001 は、収率 59.2%と LotKS14001 より若干低いものの、HPLC 純度は 84.9%と良好な結果であった。小スケール、nonGMP 時と大きな違いはなく、第一工程については安定しているものと考えられる。

②第二工程

CDA370g にジクロロメタン 3996mL とトリエチルアミン 315g を添加して、窒素置換した。窒素置換後、氷冷してクロロアセチルクロライド 351g 添加し、10℃以下でクロロアセチル化反応を行い、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)反応液(以下 CPCA)反応液を得た。CDA 残存が規定内であることを確認後、反応液を濾過洗浄して粗 CPCA 結晶 wet 体を得た。得られた wet 体をジクロロメタンで 3 回スラリー洗浄後、濾過、乾燥して粗 CPCA を 535.5g 得た。粗 CPCA535g にテトラヒドロフラン/シクロペンチルメチルエーテル(2:1)溶液 6954mL を加え、攪拌しながら 70~80℃に加温して溶解させた。溶解後、徐々に温度を下げて晶析させ、10℃以下で 2 時間以上攪拌した後、濾過、洗浄後、45℃で減圧乾燥させて CPCA 結晶 429.5g を得た。

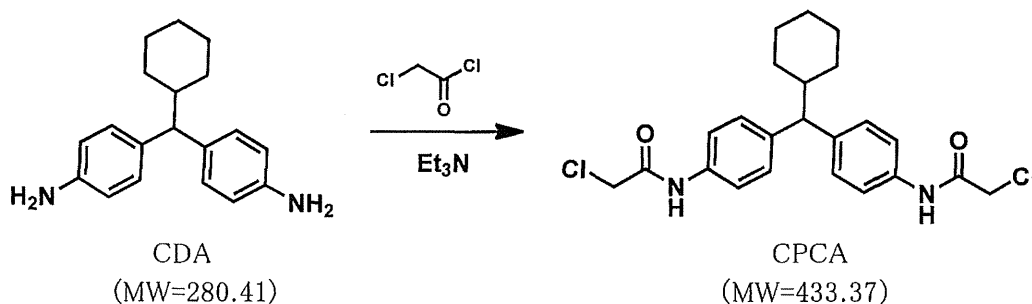


図 2: 第二工程合成ルート

予め設定した管理項目を表-3 に結果のまとめを表-4 に示す。

表 3: 第二工程 管理項目結果まとめ

工程	項目	基準	nonGMP	GMP 15001
クロロアセチル化反応	反応温度	10℃以下	10℃以下	-2.9~5.4℃
	CDA 残存量	HPLC エリア 1%以下	N.D.	0.02%
ジクロロメタン洗浄-1	攪拌時間	10 分以上	13 分	25 分
ジクロロメタン洗浄-2	攪拌時間	10 分以上	20 分	14 分
ジクロロメタン洗浄-3	攪拌時間	10 分以上	15 分	20 分
再結晶	晶析温度	10℃以下	0.4~8.0℃	0.4~9.7℃
	晶析時間	2hr 以上	2hr	2hr
乾燥	乾燥減量	1%/hr 以下	0.7%/hr	0.09%/hr

表-3 に示したように、予め設定した管理項目については、すべて基準内であった。



表 4: 第二工程結果まとめ

項目	東京化成 LotFA5QJ	25g 実験	100g 実験	Non-GMP LotKS14001	GMP Lot15001
仕込み原料	426g	10.0g	124.2g	385g	370g
反応時間	3hr	1hr20min	2.5hr	0.5hr	0.5hr
粗体収量	625g	16.94g	195.6g	554.9g	535.5g
粗体収率	94.9%	109.6%	91.7%	93.3%	93.6%
粗体 HPLC 純度	—	97.80%	98.5%	98.4%	98.1%
精製収量	515g	10.99g	153.97g	450.8g	429.5g
精製後収率	78.2%	71.1%	75.0%	75.8%	75.0%
精製品 HPLC 純度	—	99.30%	98.9%	98.7%	99.5%

表-4 に示したように Lot15001 は、収率 75.0%、HPLC 純度 99.5%と良好な結果であった。収率、純度とも小スケール、nonGMP とほぼ同等の結果であった。第二工程についても安定的に処理ができているものと考えられる。

### ③第三工程

ピロリジンに CPCA429g を分割添加し、室温で攪拌してピロリジン付加反応を行い、P092 反応液を得た。反応液をイオン交換水、飽和食塩水で順次洗浄後、有機層を硫酸マグネシウムで脱水し、減圧濃縮により粗 P092 を 497g 得た。次に粗 P092 497g にテトラヒドロフラン/ジイソプロピルエーテル(2.5:1)溶液を 3478mL 加え、攪拌しながら 70~80℃に加温して溶解させた。溶解後、徐々に温度を下げて晶析させ、10℃以下で 2 時間以上攪拌した後、濾過、洗浄後、45℃で減圧乾燥させて P092 再結晶体を 492g 得た。得られた P092 再結晶体 492g に無水エタノールを 2982mL 加え 70~80℃加温して溶解させた後、徐々に温度を下げて晶析させ、10℃以下で 2 時間以上攪拌した。濾過、洗浄後、45℃減圧乾燥させて P092 を 408g 得た。

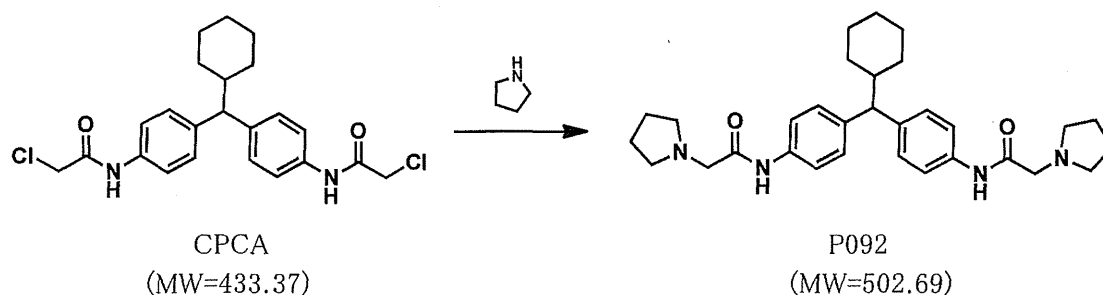


図 3: 第三工程合成ルート

予め設定した管理項目を表-5 に結果のまとめを表-6 に示す。

表 5: 第三工程 管理項目結果まとめ

工程	項目	基準	nonGMP	GMP 15001
ピロリジン付加反応	反応温度	1~30℃	21.2~25.6℃	21.2~25.7℃
	HPLC r.r.t.1.20 付近 imp	1%以下	N.D.	0.02%
再結晶	晶析温度	10℃以下	0.7~8.3℃	0.7~9.6℃
	晶析時間	2hr 以上	2hr	2hr
濾過-2	HPLC r.r.t.1.26 付近 imp	0.1%以下	0.11%	0.003%
乾燥-1	乾燥減量	1%hr 以下	-	-
エタノール再結晶	晶析温度	10℃以下	0.9~9.9℃	0.9~9.1℃
	晶析時間	2hr 以上	2.5hr	3hr
濾過-3	HPLC r.r.t.1.16 付近 imp	0.1%以下	0.17%	0.14%
エタノール再結晶-2	晶析温度	10℃以下	0.4~7.7℃	0.4~7.8℃
	晶析時間	2hr 以上	2hr	2hr
濾過-3	HPLC r.r.t.1.16 付近 imp	0.1%以下	0.07%	0.06%
乾燥-2	乾燥減量	1%/hr 以下	0.24%	0.00%

表-5 に示したように、予め設定した管理項目については、すべて基準内であった。なお、エタノール再結晶については、1 回目の処理で HPLC r.r.t.1.16 付近の imp が 0.14%(HPLC area%)と基準を超えていたため、2 回目の再結晶を実施し、0.06%(0.1%以下)とした。

表 6: 第三工程結果まとめ

項目	東京化成 LotFA5QJ	25g 実験	100g 実験	Non-GMP LotKS14001	GMP Lot15001
仕込み原料	515g	10.0g	153g	450g	429g
反応時間	18hr	22hr	109hr	20.5hr	21.5hr
粗体収量	580g	11.44g	173.29g	519.2g	496.5g
粗体収率	96.8%	98.6%	97.6%	99.5%	99.8%
粗体 HPLC 純度	-	98.60%	98.4%	98.7%	98.5%
精製1収量	-	11.56g	143.9g	521.5g	491.8g
精製1収率	-	99.7%	81.2%	99.9%	98.9%
精製品1HPLC 純度	-	99%	98.8%	99.3%	99.5%
精製2収量	450g	9.62g	119.9g	440.5g	-
精製2収率	75.3%	82.90%	67.8%	84.4%	-
精製品2HPLC 純度	-	99.40%	99.2%	99.3%	99.6%
精製3収量	-	-	115.8g	425.4g	408.0g
精製3収率	-	-	65.4%	81.5%	82.1%
精製品3HPLC 純度	-	-	99.4%	99.6%	99.7%

表-6 に示したように Lot15001 は、収率 82.1%、HPLC 純度 99.7%と良好な結果であった。100g スケールにおいて認められた反応遅延は、LotKS14001、Lot15001 で確認されず、原料の分割添加時間と添加後の反応温度をコントロールする対策が効果的であったと判断する。Imp4 の area%については 0.003%と目標の 0.10%以下にすることができた。THF/IPE 溶液による再結晶を 1 回で目標を達成できたことから当初予定していた回数を増やす(2 回実施)必要はなかった。以上の結果から、第三工程についても安定的に製造が行えるものと考えられる。



表 8: 第四工程 精製 工程管理項目 まとめ

工程	項目	基準	nonGMP	GMP 15001
溶解	溶解温度	70～80℃	77.9℃	77.4℃
晶析	晶析温度	10℃以下	0.3～10℃	0.5～10℃
	晶析時間	2hr 以上	2.4hr	2hr
乾燥	残留溶媒エタノール	3500ppm 以下	2219ppm	50ppm

表-8 に示したように、予め設定した管理項目については、すべて基準内であった。

第四工程 粗体、精製の製造結果を表-9 に示す。

表 9: 第四工程 製造結果まとめ

項目	東京化成 LotFA5QJ	25g 実験	100g 実験	Non-GMP LotKS14001	GMP Lot15001
仕込み原料	450g	8.00g	60g	400g	400g
反応時間	4hr	4hr	5hr	4hr	4hr
粗体収量	719g	12.49g	91.7g	624.7g	602.3g
粗体収率	109%	107%	104.6%	106.7%	103.0%
粗体 HPLC 純度	—	99.40%	99.5%	99.7%	99.8%
精製収量	584g	10.77g	4.22g	506.5g	519.2g
精製後収率	88.9%	92.1%	88.3%	86.6%	88.7%
精製晶 HPLC 純度	99.6%	99.5%	99.6%	99.7%	99.9%
Total yield	25.5%	33.9%	26.6%	33.2%	32.3%

表-9 に示したように、精製後収率は 88.7% で LotKS14001 とほぼ同等、HPLC 純度は 99.9% と若干良い結果となった。第一工程から Total 収率は 32.3% と小スケールおよび nonGMP とほぼ同じで、安定的に製造が行えるものと判断した。結晶の着色については、炭処理により粗体の着色は改善されたが、精製工程の加温溶解操作で着色が強くなった結果、LotKS14001 と同様、精晶に若干の黄色着色が認められた。