

医薬品開発における  
分子複合体プラットフォームの設計と物性  
評価に関する研究

2018 年

谷田 智嗣

# 目次

緒言 .....	5
1. 第 1 章 同形構造に着目した CH5134731 の共結晶デザイン .....	10
1.1 序論 .....	10
1.2 試料ならびに実験方法 .....	11
1.2.1 試料 .....	11
1.2.2 結晶化スクリーニング .....	11
1.2.3 溶媒和結晶の調製 .....	12
1.2.4 安息香酸共結晶の調製 .....	12
1.2.5 粉末 X 線回折 (XRPD) .....	13
1.2.6 単結晶構造解析 .....	13
1.2.7 示差熱重量同時測定 (TG/DTA) .....	13
1.2.8 NMR 測定 .....	13
1.2.9 溶出試験 .....	14
1.2.10 溶解度測定 .....	14
1.2.11 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) .....	14
1.3 結果・考察 .....	15
1.3.1 スクリーニング結果 .....	15
1.3.2 フリー体溶媒和結晶 .....	15
1.3.3 安息香酸共結晶 .....	17
1.3.4 CH5134731 に対するコフォーマーのモル比 .....	18
1.3.5 単結晶構造解析 .....	19
1.3.6 同形構造 .....	22
1.3.7 溶解性評価 .....	25
1.4 結論 .....	26
2 第 2 章 TOFOGLIFLOZIN における塩共結晶の検討 .....	28

<b>2.1</b>	<b>序論 .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2</b>	<b>試料ならびに実験方法 .....</b>	<b>30</b>
2.2.1	試料 .....	30
2.2.2	塩共結晶スクリーニング .....	30
2.2.3	塩共結晶のスケールアップ .....	30
2.2.4	XRPD.....	30
2.2.5	単結晶構造解析 .....	31
2.2.6	熱分析 .....	31
2.2.7	水分吸脱着等温線 (DVS) 測定 .....	31
2.2.8	加熱顕微鏡観察 .....	31
<b>2.3</b>	<b>結果および考察 .....</b>	<b>32</b>
2.3.1	TFG 塩結晶スクリーニング .....	32
2.3.2	TFG 塩共結晶の単結晶構造解析 .....	35
2.3.3	固体物性評価 .....	40
<b>2.4</b>	<b>結論 .....</b>	<b>45</b>

### 3 第3章 ウルソデオキシコール酸を用いたアモルファス非臨床製剤の開発 47

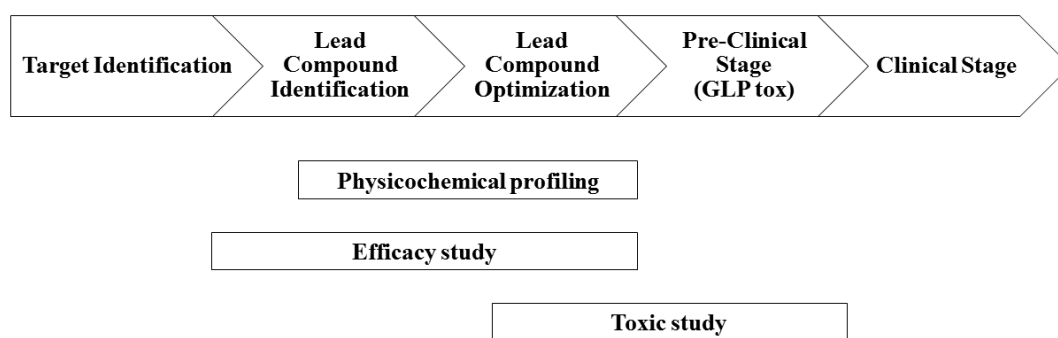
<b>3.1</b>	<b>序論 .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>試料ならびに実験方法 .....</b>	<b>49</b>
3.2.1	試料 .....	49
3.2.2	Solvent casting 法を用いたスクリーニング .....	49
3.2.3	スプレードライによるアモルファスのサンプル調製 .....	50
3.2.4	懸濁液の調製 .....	50
3.2.5	溶解度測定 .....	50
3.2.6	物理安定性評価 .....	51
3.2.7	分子体積 .....	51
3.2.8	XRPD.....	51
3.2.9	温度変調示差走査熱量計 (mDSC) によるガラス転移点の測定 .....	52
3.2.10	ラマン分光 .....	52

3.2.11	DVS .....	52
3.2.12	電界放出型電子顕微鏡 (FE-SEM) .....	52
<b>3.3</b>	<b>結果および考察 .....</b>	<b>53</b>
3.3.1	スクリーニング結果 .....	53
3.3.2	スプレードライで調製したサンプルの固体物性評価 .....	55
3.3.3	NIF-UDCA と NIF-PVP の物性比較 .....	56
3.3.4	1%MC 水溶液中の固体状態評価 .....	62
<b>3.4</b>	<b>結論 .....</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>両親媒性コポリマーの物性を利用した非晶質固体分散体の開発と評価 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>序論 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>試料ならびに実験方法 .....</b>	<b>68</b>
4.2.1	試料 .....	68
4.2.2	表面張力測定 .....	68
4.2.3	濁度測定 .....	69
4.2.4	動的光散乱測定 (DLS) .....	69
4.2.5	等温滴定型カロリメトリー測定 (ITC) .....	69
4.2.6	アモルファス固体分散体の調製 .....	69
4.2.7	溶解度測定 .....	70
4.2.8	溶出試験 .....	70
4.2.9	XRPD 測定 .....	70
<b>4.3</b>	<b>結果および考察 .....</b>	<b>71</b>
4.3.1	Soluplus®の水中におけるミセル機構 .....	71
4.3.2	Soluplus®による溶解度改善 .....	74
4.3.3	Soluplus®をキャリアとした固体分散体の調製 .....	75
4.3.4	PMs および ASDs の溶解性評価 .....	76
<b>4.4</b>	<b>結論 .....</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>総括 .....</b>	<b>80</b>

6	謝辞 .....	82
7	参考文献 .....	83
8	論文目録 .....	94

## 緒言

現在、医薬品は従来の低分子医薬品に加え、抗体医薬品、核酸医薬品、ペプチド医薬品など、分子モダリティが多様化しているが、患者にとって利便性が高い経口での投与が可能となるのは低分子医薬品のみである。一般的な低分子創薬プロセスは大きく分けて、5つのステージに分かれている (Figure 1)。

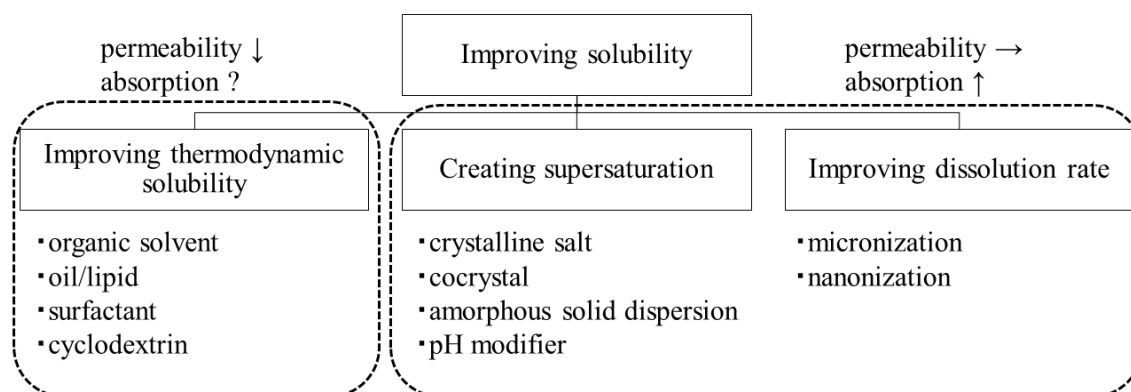


**Figure 1. The process of drug discovery and development.**

1990年代より発展したコンビナトリアルケミストリーにより化合物ライブラリーとリード化合物探索のためのハイスループットスクリーニングが低分子医薬品の創薬に大きく貢献し、ターゲットの同定やリード化合物の同定を効率よく実施できるようになり、多数の医薬品候補化合物を見出すことが可能になっている。しかしながら、見出されるリード化合物は難水溶性化合物であることが多く<sup>1,2)</sup>、そのリード化合物を基に構造の最適化がなされた化合物も水溶性に乏しく、各製薬企業のパイプラインにある化合物のうち70–90%が難水溶性化合物であると考えられている<sup>3)</sup>。化合物の構造最適化の段階では薬効、安全性、薬物動態に加え物性も考慮し、メディシナルケミストは化合物をデザインするが、創薬ターゲットが減少し競合がますます激化する低分子医薬品の開発において、すべてに優れた化合物を見出すことは極めて困難である。これら項目の中で水溶性に代表される物性は医薬品分子の構造を変えことなく改善することができるため、物性研究者が創薬に大きく貢献できる点である。創薬プロセスではリード化合物や最適化の過程で化合物を動物に投与し、薬効や安全性を確認する必要がある。しかしながら難水溶性薬物の場合

は製剤化による工夫無しでは十分な血中濃度が得られず，特に高暴露が要求される毒性試験では目標となる血中濃度が得られない事が多い．物性研究者は化合物の物理化学的特性からその化合物に適した溶解性改善方法を適用する必要がある．

難水溶性化合物の溶解性改善を検討する際には **solubility-permeability interplay** に注意する必要がある<sup>4-7)</sup>．溶解度 (**solubility**) は大別すると，固体と溶液中の溶質の平衡状態を表す **thermodynamic solubility** と過飽和による見かけの溶解性や溶解速度を表す **kinetic solubility** の2つに分類される．溶解性改善技術と **solubility-permeability interplay** の関係を Figure 2 に示す．界面活性剤によるミセル形成は **thermodynamic solubility** を改善し，界面活性剤濃度が高ければ高いほど化合物の溶解度も高くなる．しかしながら膜透過性は低下してしまうため，界面活性剤濃度が高すぎると吸収が低下してしまうことがある．同じく **thermodynamic solubility** を改善する有機溶媒やシクロデキストリンなども同様であり，溶解度改善効果とのバランスが重要となる．一方で **kinetic solubility** を改善する溶解性技術は吸収部位で過飽和を形成させる技術と溶解速度を改善する技術に分かれ，これらは化合物の **permeability** に影響を与えない．特に前者は吸収部位における化合物濃度を向上させることができ，高い吸収改善効果が期待できる．



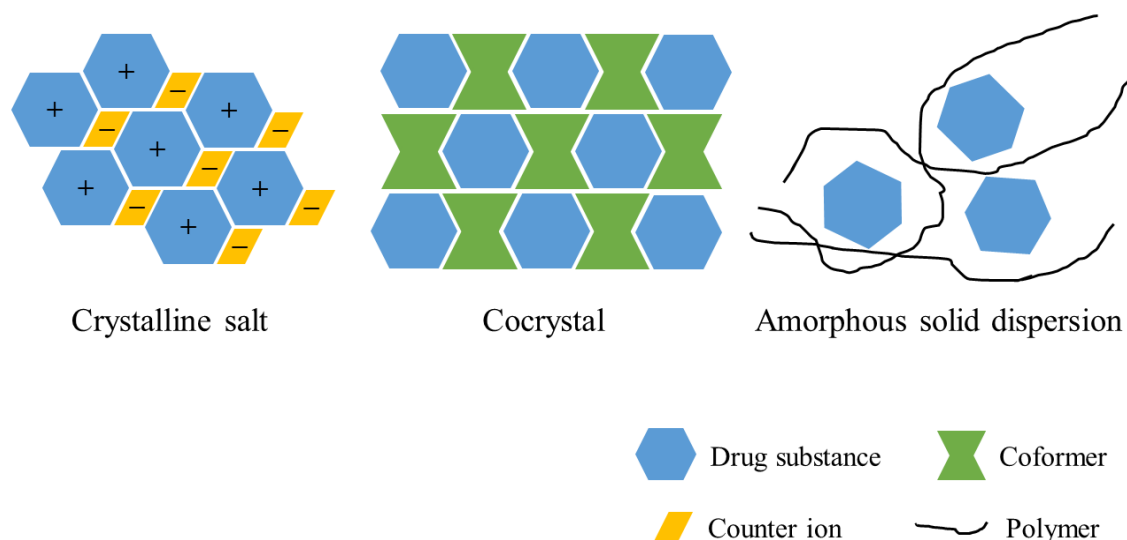
**Figure 2. The summary of solubility improvement technologies**

低分子における医薬品原薬は合成過程での単離精製，長期保存時の物理化学的安定性の観点から結晶であることが所望され，上市品のうちアモルファスが原薬に選ばれているものは5製品のみである<sup>8)</sup>．そのため塩結晶や共結晶は結晶でありながら溶解性の改善が期

待できる分子複合体技術 (Figure 3) であり, 多くの研究がなされてきた. 塩結晶は解離基を有した医薬品分子とその対イオンとの複合体が結晶化しているものであり, 一般的には分子同士の  $pK_a$  差が 2–3 以上あれば塩を形成<sup>9, 10)</sup>することが可能と考えられ, 通常の結晶と同様に塩結晶も多形や水和結晶などの疑多形を有する. 一方, 共結晶は塩結晶と同じく結晶格子内に複数の化合物を含む分子複合体結晶であるが, 分子間にイオン結合は必要ない. すなわち医薬品分子が解離基を有する必要は無く, 幅広い分子で適応することが可能である. ここでは医薬品分子と複合体を形成する分子の事をコフォーマーと記載するが, 一般的にはコフォーマーが常温で固体であるものが共結晶であり, 液体のものは溶媒和結晶と定義される. 数年前まで, 共結晶については申請上の区分がアメリカ食品医薬品局 (FDA) と欧州医薬品庁 (EMA) で見解が分かれていた. FDA が 2013 年に出したガイドラインでは共結晶は製剤中間体 (drug product intermediate) であり<sup>11)</sup>, EMA が 2015 年に出した Reflection paper では原薬 (drug substance, active pharmaceutical ingredient) と定義され<sup>12)</sup>, グローバルで開発を進めたい企業にとって共結晶は選択しにくい溶解性改善技術であった. しかし, FDA の見解に意を唱える研究者たちも数多く存在し<sup>13)</sup>, 2016 年に FDA は 2016 年のガイドラインにて共結晶を原薬とすると決定した事から<sup>14)</sup>, 製薬企業として共結晶は溶解性改善技術の選択肢の一つとして再度注目を集める事となった. ただ, 日本国内においては明確な方針が定められておらず, 大学や企業の有志メンバーにて様々な提言がなされている<sup>15, 16)</sup>.

一方でアモルファス固体分散体は製剤に適応できる溶解性改善技術である. 通常, アモルファスは不規則な分子配列構造を有しており, 規則的な分子配列構造である結晶と比較するとエネルギー状態は高い<sup>17)</sup>. そのため高い溶解性が期待されるが, 固体状態においては熱力学的に不安定であり, 保存時により熱力学的に安定な結晶へと転移してしまう可能性がある. この問題を解決するため, 親水性ポリマー中に医薬品分子を分散させ熱力学的安定性向上を目指した分子複合体技術がアモルファス固体分散体である<sup>18)</sup>.





**Figure 3. The type of molecular complex for improving the solubility**

開発戦略にもよるが一般的には原薬形態は **Pre-clinical** ステージに入る前に決定され、製剤に関する検討も同じころに開始される。この段階では使用できる化合物量に制限があり、かつスピードが求められる中で物性研究者は医薬品候補化合物の物理化学的特徴から、化合物に適した溶解性改善技術を選択しなければならない。そのためには何か1つの技術を有するのではなく、複数の溶解性改善技術を有し、さらにそれらを少量かつ短期間で評価できるプラットフォームが必要になる。そのため、塩結晶や共結晶については種々の結晶化方法を利用した優れたスクリーニング方法の研究が多くなされており<sup>19-24)</sup>、アモルファス固体分散体についてもキャリアとなる水溶性ポリマーの選択や比率を最適化するための効率的な探索方法の研究が報告されている<sup>25-27)</sup>。

これまでに創薬プロセスにおける物性改善技術として、分子複合体技術の現状を述べた。本稿では分子複合体技術のさらなる可能性に着目し、著者がこれまで得られた原薬および製剤に関する研究結果および考察を第1章から第4章に記載した。

第1章では医薬品候補化合物であり難水溶性である CH5134731 について、共結晶の設計と物性評価を実施した。共結晶を得るためには大規模なスクリーニングにより適切なコフォーマーを見つける必要があるが、本研究では CH5134731 の溶媒和結晶が同形構造を

形成することと溶媒分子の類似性から安息香酸共結晶を見出すことに成功した。粉末 X 線回折，単結晶構造解析および熱分析の結果から考察するとともに得られた共結晶の溶解性を評価した。

第 2 章では 2 型糖尿病治療薬である tofogliflozin (TFG) の塩共結晶に関する研究を行った。塩共結晶は医薬品分子，コフォーマー，さらにカウンターイオンで形成された 3 成分の分子複合体原薬であるが，報告された事例は少ない。slurry 法と liquid-assisted grinding 法によるスクリーニングにより TFG-sodium acetate 塩共結晶と TFG-potassium acetate 塩共結晶を見出した。また結晶構造解析から構成成分の比率を決定し，TFG 分子はどちらの結晶構造中においても同じコンフォメーションを示しているが，パッキングが異なる事を明らかにした。さらにそれぞれの塩共結晶について詳細に物性評価を行い，結晶多形やそれらの熱力学的な関係性について考察した。

第 3 章では胆汁酸成分であるウルソデオキシコール酸 (UDCA)を用いた分子複合体製剤に関する研究を行った。solvent casting によるスクリーニングで見出したニフェジピン (NIF)，インドメタシンおよびナプロキセンと UDCA とのアモルファス複合体について物性評価を実施した。1%メチルセルロース水溶液中で従来のアモルファス固体分散体と比べ高い物理安定性を示すことが分かり，特に毒性試験等で用いる非臨床製剤として有用性が高いことを確認した。

第 4 章では難水溶性薬物であるイプリフラボンについて Soluplus®をキャリアとしたアモルファス固体分散体を調製し，その溶解性を評価した。Soluplus®はミセル形成を有するポリマーとして知られているが，そのミセル形成機構については明らかになっていない。そこで水中における表面張力の測定から得られた Soluplus®の臨界ミセル濃度と関連付け，溶解性改善メカニズムについて考察を行った。

以下，各章にて得られた知見および考察を詳細に記載するとともに，最後に総括する。

# 1. 第 1 章 同形構造に着目した CH5134731 の共結晶デザイン

## 1.1 序論

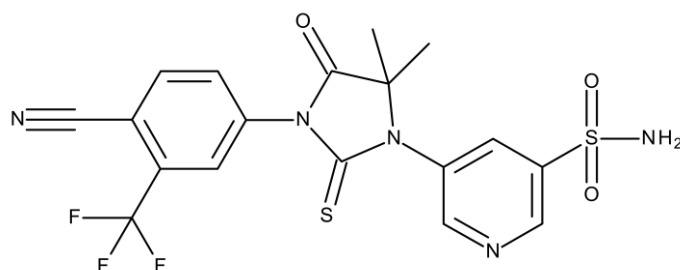
原薬形態へ塩結晶や共結晶といった分子複合体技術を適応する際、カウンターイオンやコフォーマーの選択が重要になる。塩結晶の場合は原薬とイオン結合を形成するため、 $\Delta pK_a$  からカウンターイオン種を絞り込むことは可能であるが、共結晶の場合は原薬とコフォーマーの結合様式は水素結合やファンデルワールス力であるため、多くの化合物がコフォーマー候補となる。そのため両化合物の水素結合パターンに着目した検討<sup>28-32)</sup>や熱力学的な計算<sup>33-36)</sup>を用いた検討によりコフォーマーを選択する試みがなされている。しかしながら結晶化過程の予測は難しく<sup>35)</sup>、多くのコフォーマーとの組み合わせによる網羅的なスクリーニングが必要になるが、化合物の使用量や検討時間が限られている創薬研究ではすべての検討を行う事はできない。本章ではフリー体溶媒和結晶の類似性（同形構造）から、コフォーマーを選択することで効率的な原薬形態設計を行った研究結果について記述する。

始めに溶媒和結晶と同形構造に関する説明を記載する。溶媒和結晶は結晶構造中に溶媒を含有した結晶であり、水和結晶を除いて水への溶解度は非溶媒和結晶よりも高い事が多く、溶解性改善が期待されるが安全性および安定性（溶媒の脱離）の観点からは原薬形態として選択することが難しい。溶媒和結晶が原薬形態として選択され上市された例としては、エタノール溶媒和結晶としてプリジスタ®錠（ダルナビル エタノール付加物）、クリキシバン®カプセル（インジナビル硫酸塩エタノール付加物）、ランデル®錠（エホニジピン塩酸塩エタノール付加物）が、アセトン溶媒和結晶としてはジェブタナ®点滴静注（カバジタキセル アセトン付加物）、ハーボニー®配合錠（レジパスビル アセトン付加物）などがあるが、ごく稀である。一般的には塩結晶や共結晶の検討に先立ってフリー体の結晶化スクリーニングが実施されるため、初期段階にフリー体の溶媒和結晶の固体およびそれらの物性データが取得される。しかし、晶析溶媒を検討する際の擬多形情報として考慮されることはあるが、積極的に溶媒和結晶の物性データが利用されることはほぼ無い。

同形構造とは分子コンフォメーションがほぼ同一であり、類似したパッキング構造を持つ結晶のことで、それらを互いに同形と言い、無機物だけでなく医薬品原薬を含む有機物

での事例も複数報告されており<sup>37-41)</sup>, 溶媒和結晶以外の同形構造についてもいくつか報告されている<sup>42-46)</sup>. しかしながら, 創薬において結晶構造デザインにまで発展させた事例はほとんどない<sup>39, 47)</sup>.

CH5134731 (Figure 4) は中外製薬株式会社で創製された医薬品候補化合物である<sup>48-51)</sup>. 本化合物は難水溶性化合物であり, 本章におけるモデル化合物とした. 溶媒和結晶と共結晶の同形構造についてそれぞれの結晶構造から考察し, さらに溶解性の評価を実施した.



**Figure 4. The chemical structure of CH5134731 (androgen receptor pure antagonist drug)**

## 1.2 試料ならびに実験方法

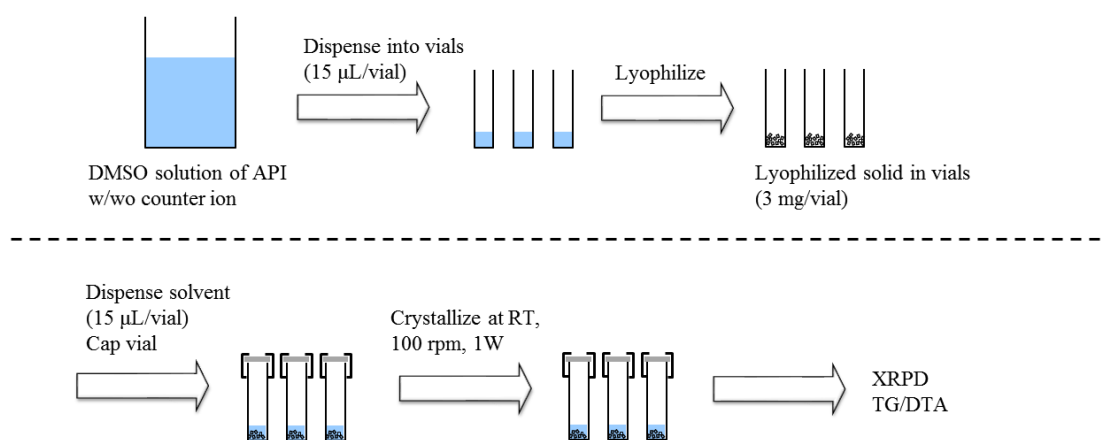
### 1.2.1 試料

CH5134731 は中外製薬株式会社に提供いただいた. 安息香酸は和光純薬工業から入手した. 各種溶媒やその他の物質はそれぞれ化学メーカーから入手した.

### 1.2.2 結晶化スクリーニング

スクリーニング方法を Figure 5 示す. フリー体結晶のスクリーニング用に CH5134731 をジメチルスルホキシド (DMSO) に 200 mg/mL の濃度で溶解し, 15  $\mu$ L ずつ 0.6 mL のガラスバイアルに分注した. また, 塩結晶のスクリーニングのためにカウンターイオンを含んだ DMSO 溶液を 200 mg/mL の濃度で調製した. この際に用いたカウンターイオンはナトリウム, カリウム, カルシウム, L-アルギニン, 塩酸, 臭化水素酸, 硫酸, メタンサルホン酸であり, CH5134731 とモル比 1 : 1 にて調製した. フリー体と同じくそれぞれの

DMSO 溶液を 15  $\mu\text{L}$  ずつ 0.6 mL のガラスバイアルに分注した。その後、 $-20^{\circ}\text{C}$  にて凍結乾燥を 48h 実施し、乾燥粉末を得た。得られた粉末に結晶化溶媒を 15  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、ロータリーシェイカー（NR-30, TAITEC Corporation）を用いて、100rpm で室温にて攪拌を行った。1 週間後、得られた固体を粉末 X 線回折（XRPD）と熱分析（TG/DTA）を用いて評価した。



**Figure 5. Screening flow for crystallization using slurry method**

### 1.2.3 溶媒和結晶の調製

CH5134731 にベンジルアルコールを 30 mg/mL の濃度になるように加え、 $120^{\circ}\text{C}$  にて加熱溶解後、室温に冷却することでベンジルアルコール溶媒和結晶を得た。また、CH5134731 にアニソールを 15 mg/mL の濃度になるように加え、 $120^{\circ}\text{C}$  にて加熱し懸濁液を調製した。その後、室温にてフィルターろ過をし、ろ液を室温に静置することでアニソール溶媒和結晶を得た。同様にクロロベンゼン溶媒和結晶およびトルエン溶媒和結晶を調製した。

### 1.2.4 安息香酸共結晶の調製

種結晶を得るために Liquid assisted grinding 法を行った。CH5134731 (38.6 mg) と安息

香酸 (24.1 mg) を乳鉢の上にとり，さらにプロピレングリコール/水 (1/4) 溶液を 40  $\mu$ L 加え，乳棒にて粉碎した．さらに冷却法によるスケールアップを実施した．CH5134731 (292.6 mg) に安息香酸で飽和させた 2-メチル-1-プロパノールを 9 mL 加え，105°C にて溶解させた．その後，室温に冷却し種結晶を加えることで結晶を得た．

#### 1.2.5 粉末 X 線回折 (XRPD)

XRPD データは全自動水平型多目的 X 線回折装置 (SmartLab, Rigaku) を用いて測定した．X 線は Ge(111)モノクロメーターにより Cu K $\alpha_1$  に単色化し，検出器には高速 1 次元検出器 (D/teX Ultra, Rigaku) を用いた．管電圧 45 kV，管電流 200 mA，発散スリット 1/3 $^\circ$ ，スキャン速度 5 $^\circ$ /min，ステップサイズ 0.02 $^\circ$ ，測定範囲 5–35 $^\circ$  2 $\theta$  の条件で測定を行った．

#### 1.2.6 単結晶構造解析

単結晶構造解析に必要なデータは単結晶自動 X 線構造解析装置 (R-AXIS RAPID II with a VariMax, Rigaku) を用いて取得した．X 線源に Cu K $\alpha$ ，検出器に R-AXIS RAPID II image plate detector (Rigaku) を用いた．管電圧 40 kV，管電流 30 mA，-180°C にて測定した．*SIR2004*<sup>52)</sup>を用いて直接法により初期構造を取得し，*SHELXL-97*<sup>53)</sup>を用いて構造の精密化を行った．CH5134731 の非水素原子は非等方的に精密化し，すべての水素原子は幾何学的に配置させ，Riding モデルを用いて精密化した．

#### 1.2.7 示差熱重量同時測定 (TG/DTA)

示差熱重量同時測定装置 (STA7200RV, Hitachi High-Technologies) を用いて測定した．アルミニウム製オープン試料容器にサンプルを入れ，窒素気流下，昇温速度 10 $^\circ$ C/min にて 30–350 $^\circ$ C の温度範囲を測定した．

#### 1.2.8 NMR 測定

サンプルは TMS を含む DMSO-*d*<sub>6</sub> に溶解させ，500 MHz 核磁気共鳴装置 (ECX500, JEOL) を用いて測定した．緩和時間は 30 s とした．

### 1.2.9 溶出試験

パドル法による溶出試験機（VK7010/VK8000, Varian Medical System）を用い、溶解性の評価を実施した<sup>54)</sup>。メディアには 3 mM のタウロコール酸ナトリウムと 0.75 mM のレシチンと 29 mM のリン酸緩衝液により調製した空腹時小腸模擬液（FaSSIF, pH 6.5）を用いた。また粒子径の影響を除くため、すべてのサンプルはジェットミル（Jetmill A-O JET, Seishin Enterprise）を用いて微粉碎したサンプルを用いた。また濡れ性を良くするため、ラクトースで倍散した。フリー体として 10 mg を 50 mL の FaSSIF に添加し、37°C で 4 h 処理し、経時的に溶液濃度を測定した。

### 1.2.10 溶解度測定

フリー体結晶（Free Form I, 非溶媒和結晶）の FaSSIF 中における溶解度を測定した。Free Form I の FaSSIF 懸濁液を調製し、37°C で 24 h 攪拌後、メンブランフィルター（MultiScreen 0.4  $\mu$ L polycarbonate isopore membrane, Millipore）にて固液分離し、溶液濃度を測定した。

### 1.2.11 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

溶出試験および溶解度測定試験で得られたサンプルは p-hydroxybenzoic acid n-dodecyl ester を内部標準として 0.8 mg/mL 含むテトラヒドロフランに 2 倍希釈した。HPLC 測定は以下の条件にて実施した。

装置：Waters 製 HPLC（Waters 2795 separation module and Waters 2487 dual  $\lambda$  UV/vis detector）

カラム：Cadenza CD-C18, 3 $\mu$ m, 3.0 $\times$ 50 mm

カラム温度：40°C

流速：1 mL/min

移動相：0.1%TFA-water, 0.1%TFA-acetonitrile

移動相条件：Gradient

(0-1.5 min with 60% acetonitrile, 1.51-3 min with 95% acetonitrile)

検出波長：215 nm

## 1.3 結果・考察

### 1.3.1 スクリーニング結果

ADMET predictor ver. 7.1 (Simulation Plus) を用いて CH5134731 の pKa を計算したところ 9.84 (acid), 1.83 (base) であった。一般的には $\Delta pK_a$ の値が化合物間で2から3離れていれば、塩を形成することが期待される<sup>9,10)</sup>。しかしながら、CH5134731の塩結晶はいずれの条件でも得る事はできなかった。これは $\Delta pK_a$ による計算は2分子間での計算結果であり、結晶化を予測できるものではないためである。

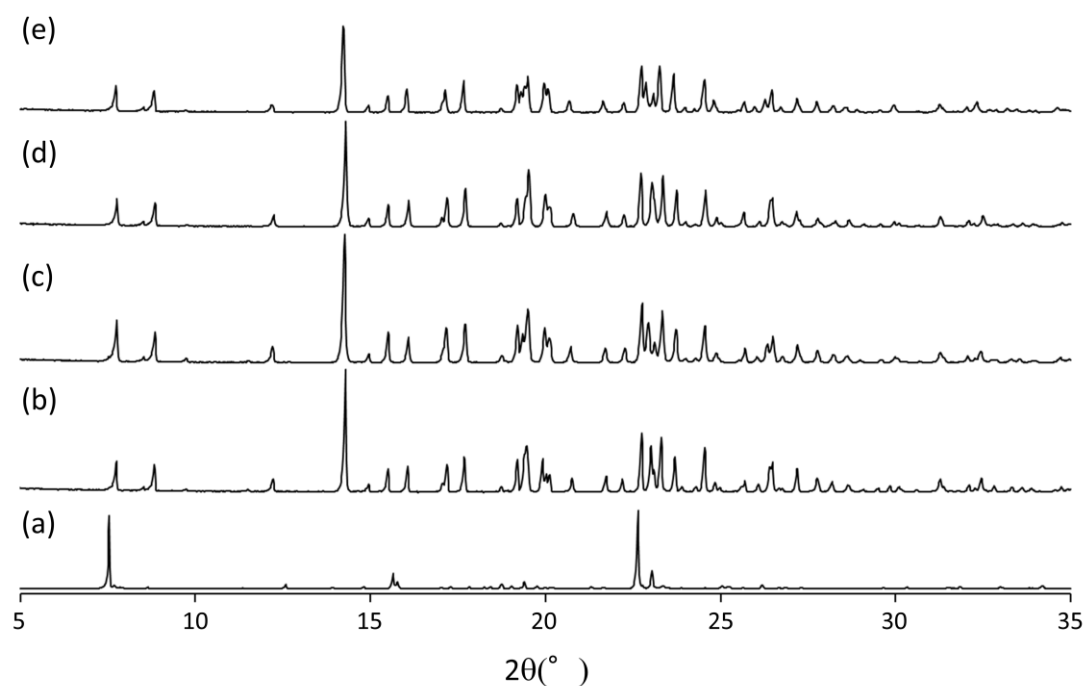
一方でフリー体のスクリーニングでは非溶媒和結晶である Free Form I, エタノール溶媒和結晶および多くのその他溶媒和結晶を得ることができた。熱力学的な観点から溶媒和結晶は過飽和を形成し、溶解性およびバイオアベイラビリティを改善できる可能性があるため、承認実績のあるエタノール溶媒和結晶は原薬候補と考えられた。しかしながら、他の溶媒和結晶は含有している有機溶媒の人に対する安全性への懸念から原薬形態として選択する事は難しいと判断された。

### 1.3.2 フリー体溶媒和結晶

Figure 6 に CH5134731 の溶媒和結晶の XRPD パターンを示す。着目するのはベンジルアルコール溶媒和結晶、トルエン溶媒和結晶、クロロベンゼン溶媒和結晶およびアニソール溶媒和結晶の XRPD パターンが非常に類似している事である。Figure 7 に示した熱分析結果にはそれぞれ2つの吸熱ピークが確認されるが、初めの吸熱ピークは溶媒和結晶の融解によるもので、もう一方は溶媒和結晶が融解後に現れた別の結晶の融解に起因するものと考えられる。また、これら熱分析の結果は溶媒和結晶が典型的に示すパターンであり、それぞれの融点（脱溶媒和の温度）と重量減少値が確認できる。重量減少値から計算されるそれぞれの溶媒和結晶中の CH5134731 と溶媒分子の化学量論比を Table 1 にまとめた。それぞれの溶媒和結晶はほぼ同じ温度で融解し、脱溶媒している事がわかった。また、ベンジルアルコール、トルエン、クロロベンゼン、アニソールの沸点はそれぞれ 205°C, 111°C, 132°C, 154°C であるが、重量減少が起こる温度との関係はない。これは溶媒和結晶の結晶格子が融解により、壊れた際に取り込まれていた溶媒分子が気体になったためと考えられる。以上の結果から、これら溶媒和結晶は固体中に含まれる溶媒分子が異なるにも関わらず、類似した固体状態を形成していると考えられる。言い換えると結晶

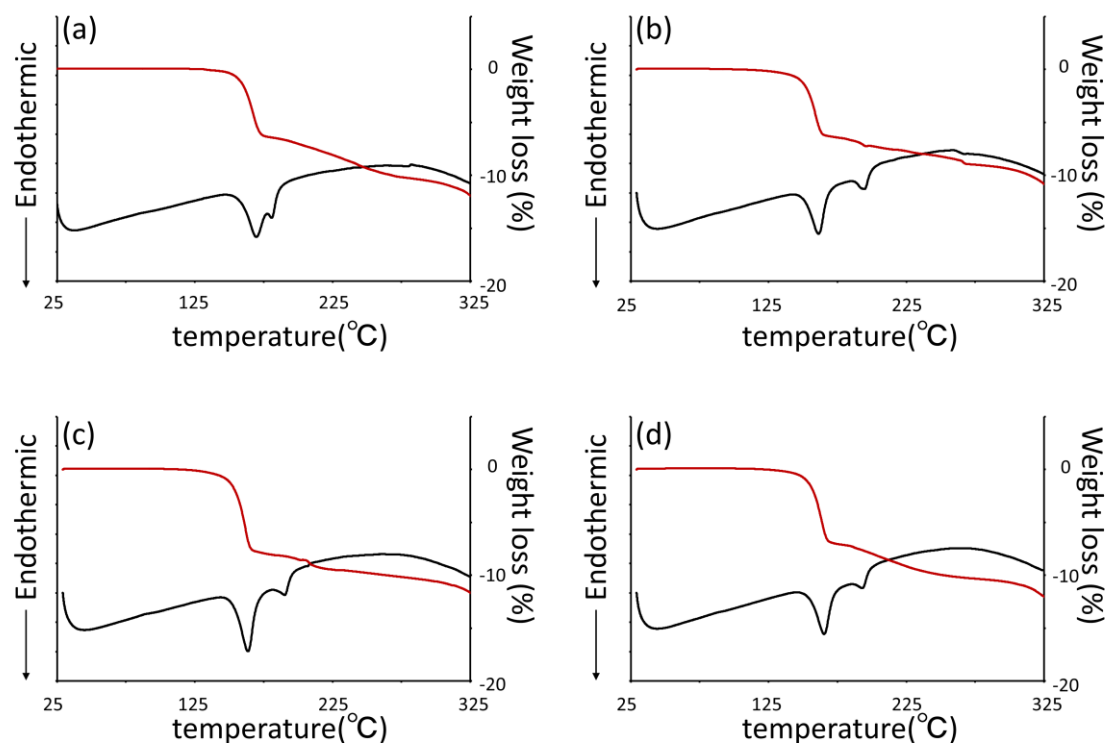


格子内で溶媒分子が入れかわることで、同形構造を有している。溶媒分子の化学構造に着目するとすべて6員環構造を持っており、類似する化合物としては安息香酸が考えられる。安息香酸は医薬品として許容できる化合物であり、安息香酸分子もこれら溶媒和結晶と同様のフレームワーク内に存在することができれば、結晶構造が保持でき原薬候補となることが示された。



**Figure 6. XRPD patterns of CH5134731 free solvates.**

(a) ethanol solvate, (b) benzyl alcohol solvate, (c) toluene solvate, (d) chlorobenzene solvate and (e) anisole solvate



**Figure 7. TG (red) and DTA (black) curves of CH5134731 solvates.**

(a) benzyl alcohol solvate, (b) toluene solvate, (c) chlorobenzene solvate and (d) anisole solvate

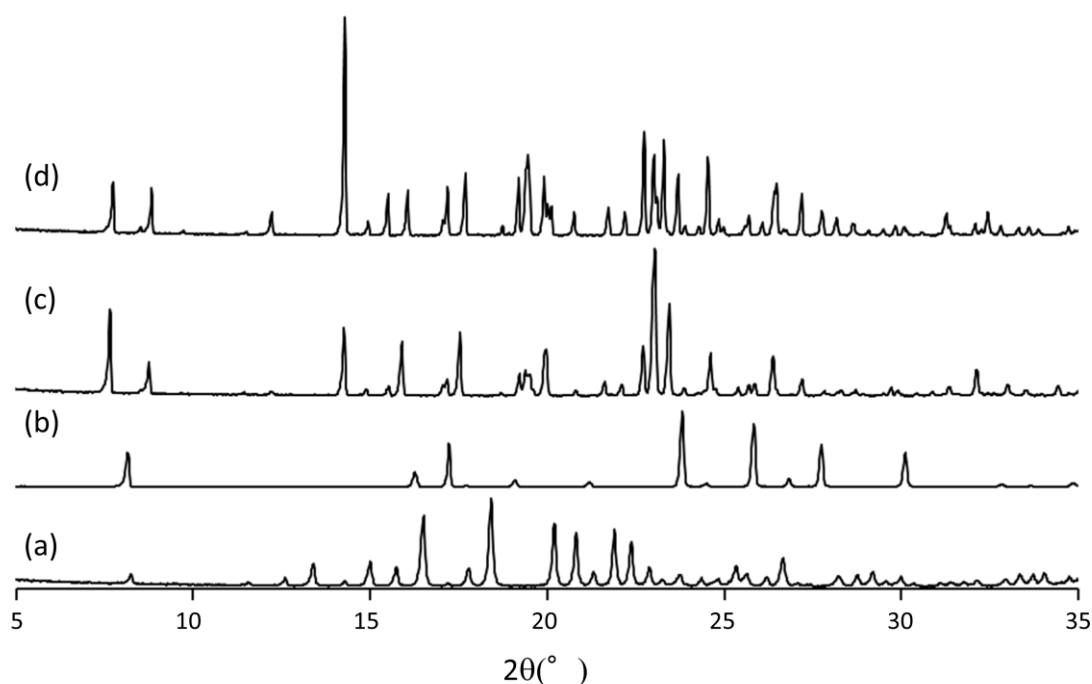
**Table 1. Summary of thermal analysis**

Form	Melting point [°C]	Weight loss [%]	Stoichiometric ratio
Benzyl alcohol solvate	157	10.1	0.5
Toluene solvate	150	8.9	0.5
Chlorobenzene solvate	151	10.1	0.5
Anisole solvate	153	10.2	0.5

### 1.3.3 安息香酸共結晶

Liquid assisted grinding 法で調製したサンプルを XRPD で評価したところ、新しい回折パターンが確認できた。しかし、回折ピークは弱く詳細な検討はできなかった。このサンプル

ルを種結晶とし、冷却法で調製したサンプルは良い結晶性 (Figure 8) を示し、予想したようにベンジルアルコール溶媒和結晶などと類似した XRPD パターンを示した。このことは同形構造を有する結晶においては分子構造の類似性などからコフォーマーを選択できる可能性を示唆した。

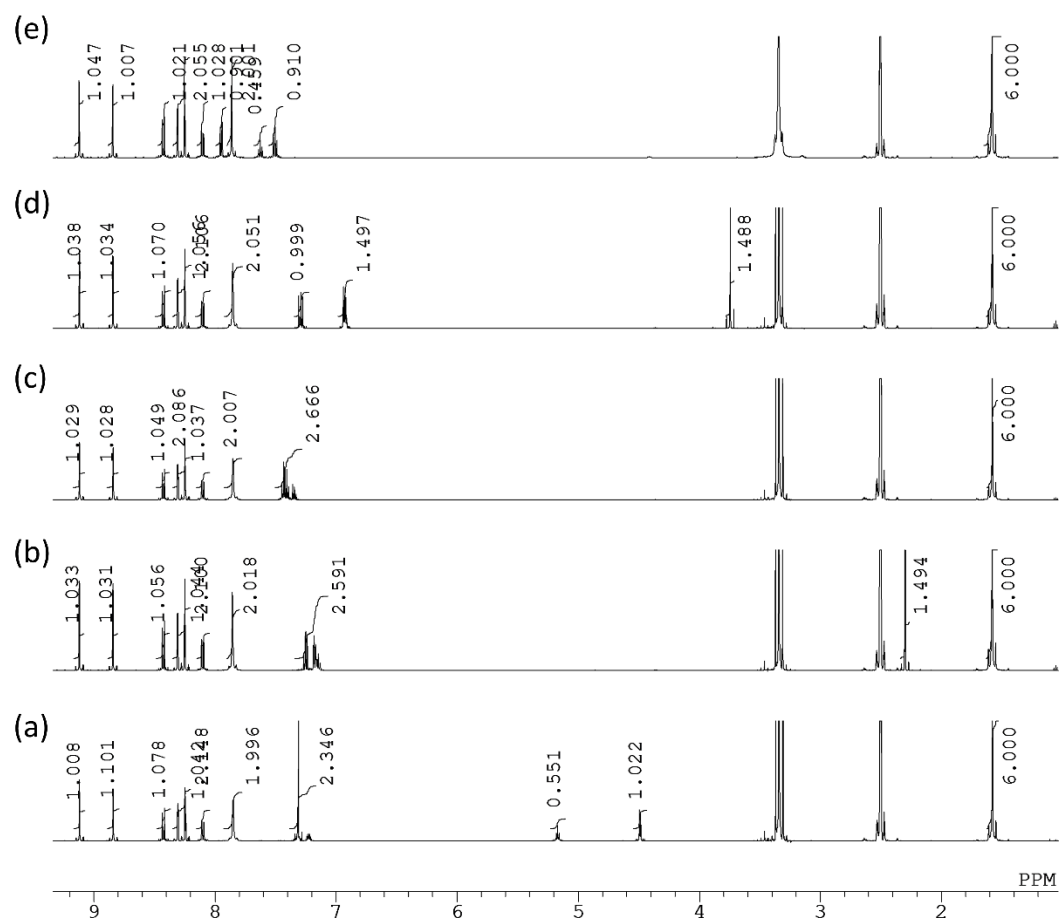


**Figure 8. XRPD patterns.**

(a) Free Form I, (b) benzoic acid, (c) benzoic acid cocrystal and (d) benzyl alcohol solvate

#### 1.3.4 CH5134731 に対するコフォーマーのモル比

<sup>1</sup>H-NMR の測定結果を Figure 9 に示す。それぞれの結晶中においてベンジルアルコール、トルエン、クロロベンゼン、アニソール、安息香酸が含まれており、さらにそれらの CH5134731 に対するモル比率が約 0.5 であることが確認された。この結果は熱分析の結果とも一致した。



**Figure 9.  $^1\text{H}$ -NMR.**

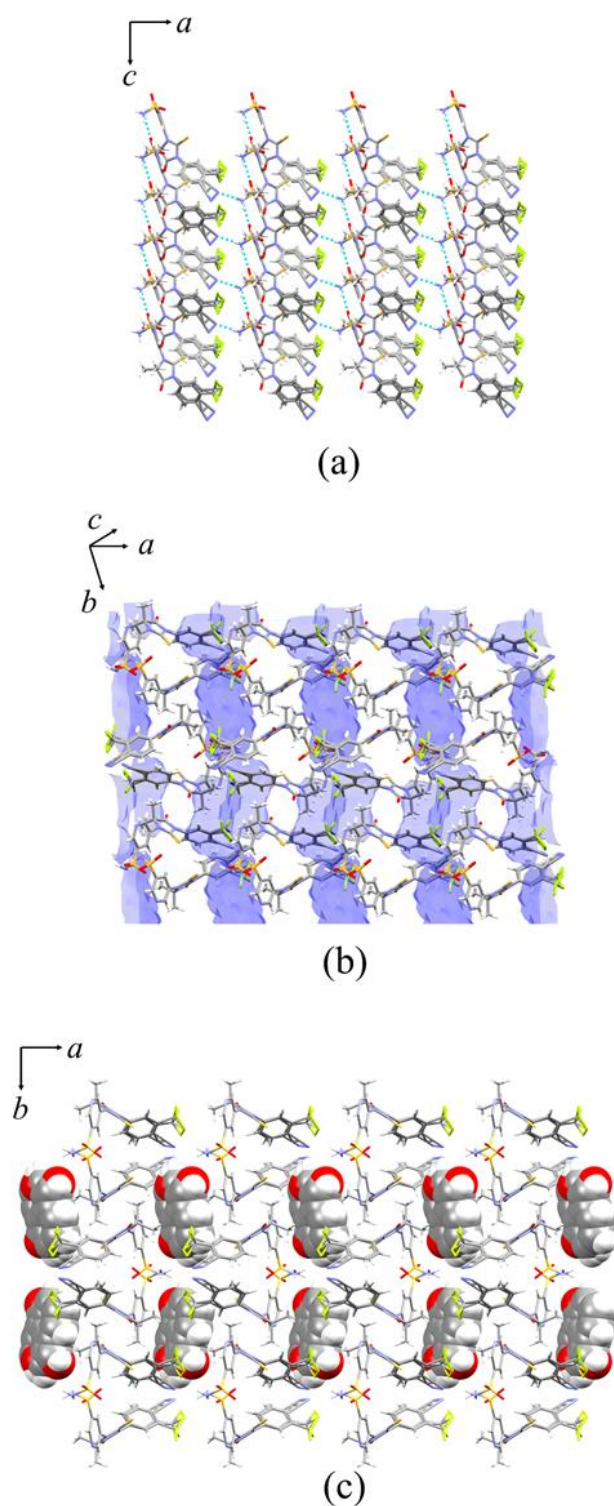
(a)benzyl alcohol solvate, (b) toluene solvate, (c) chlorobenzene solvate, (d) anisole solvate, (e) benzoic acid cocrystal

### 1.3.5 単結晶構造解析

#### 安息香酸共結晶

構造解析の結果、空間群は  $P2_1/c$  であった。CH5134731 分子の 4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl 部分は不規則構造 (disorder) をとっている事が確認されたため、2 つのパートに分けて解析を実施し、存在比率は 0.5687 および 0.4313 と計算された。安息香酸分子は対称面上で不規則構造をとっており、電子密度マップから表現することは難しかったため、rigid model を作成し解析した。単結晶構造解析により推察される構造は CH5134731 : 安息香酸が 2 : 1 であり、 $^1\text{H}$ -NMR や熱分析結果とも齟齬が無いことを確認

した．安息香酸共結晶中で CH5134731 は *ac* 軸に対して，sulfamoyl と 4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl moiety groups 間および 2 つの sulfamoyl 間の水素結合によりシート構造を持っている事がわかった (Figure 10 (a))．またシートは *b* 軸方向に水素結合無しで積み重なっており，孤立した籠のような空間を形成していた (Figure 10 (b))．さらに安息香酸分子はこの空間に水素結合無しで存在している事がわかった (Figure 10 (c))．このケースの場合，医薬品分子とコフォーマー間には弱い相互作用しかなく，強い相互作用の分子を選択する従来の超分子シントンのような考え方や熱力学的な計算では，今回のケースのような共結晶を見出すことは難しいと考えられる．



**Figure 10. The crystal structure of the CH5134731 benzoic acid cocrystal.**

(a) The hydrogen bonding of CH5134731 molecules; (b) the voids calculated using Mercury (benzoic acid is not displayed); (c) the packing diagram (benzoic acid is displayed by space-filling).

## 溶媒和結晶

ベンジルアルコール溶媒和結晶の空間群は安息香酸共結晶と同じく  $P2_1/c$  であった。精密化は先述の共結晶と同様に行い、溶媒分子は電子マップから精密化することは難しかったため、rigid モデルを使用した。溶媒分子は対称面上にあり、CH5134731：ベンジルアルコールは 2 : 1 と考えられ  $^1\text{H-NMR}$  や熱分析結果と齟齬はなかった。トルエン溶媒和結晶については単結晶が調製できなかったが、クロロベンゼン溶媒和結晶およびアニソール溶媒和結晶は良質な単結晶が得られ、ベンジルアルコール溶媒和結晶と同様の手法で構造解析を実施した。

### 1.3.6 同形構造

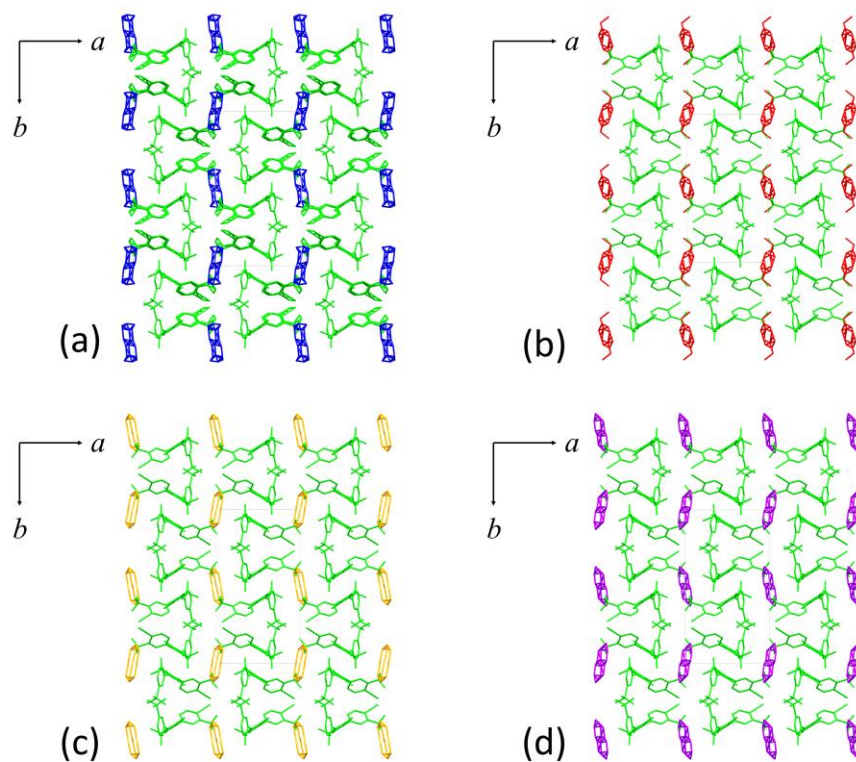
結晶構造パラメーター (Table 2) から、すべて同じ空間群であり類似した結晶格子を持っている事がわかる。また、結晶のパッキング (Figure 11) やコンフォメーション

(Figure 12) からはそれらが同形構造を取っている事を示し、コフォーマーである安息香酸や溶媒分子はすべて同じく CH5134731 で形成された孤立空間内に存在していることが確認できた。さらに CH5134731 とコフォーマーらは水素結合を持っておらず、この空間内に存在できる分子の大きさや形が結晶構造を保持するために重要である事を示唆している。

**Table 2. Crystallographic data for the CH5134731 cocrystal and solvates.**

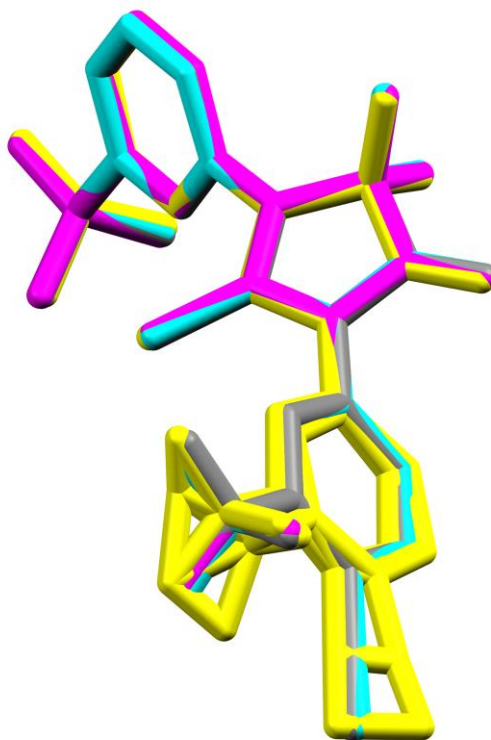
	benzoic acid cocrystal	benzyl alcohol solvate	chlorobenzene solvate	anisole solvate
Formula	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> . 0.5(C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> . 0.5(C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O)	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> . 0.5(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl)	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> . 0.5(C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O)
MW	530.52	523.53	525.74	523.53
space group	<i>P</i> 21/ <i>c</i>	<i>P</i> 21/ <i>c</i>	<i>P</i> 21/ <i>c</i>	<i>P</i> 21/ <i>c</i>
<i>a</i> (Å)	11.4209(2)	11.2642(2)	11.24851(18)	11.2994(2)
<i>b</i> (Å)	20.5581(4)	20.5587(4)	20.6292(4)	20.5599(4)
<i>c</i> (Å)	9.97928(18)	10.11845(18)	10.0577(2)	10.11464(18)
α (deg.)	90	90	90	90
β (deg.)	91.5970(11)	91.9094(7)	91.7969(9)	92.3835(8)
γ (deg.)	90	90	90	90
V (Å <sup>3</sup> )	2342.14(7)	2341.90(7)	2332.73(7)	2347.75(7)
R <sub>1</sub> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	0.0627	0.0415	0.0478	0.0376
wR <sub>2</sub> (all data)	0.1669	0.1075	0.1917	0.1019





**Figure 11. Packing diagrams of benzoic acid cocrystal and solvates.**

(a) Benzoic acid cocrystal (CH5134731: green; benzoic acid: blue), (b) benzyl alcohol solvate (CH5134731: green; benzyl alcohol: red), (c) chlorobenzene solvate (CH5134731: green; chlorobenzene: yellow) and (d) anisole solvate (CH5134731: green; anisole: purple).

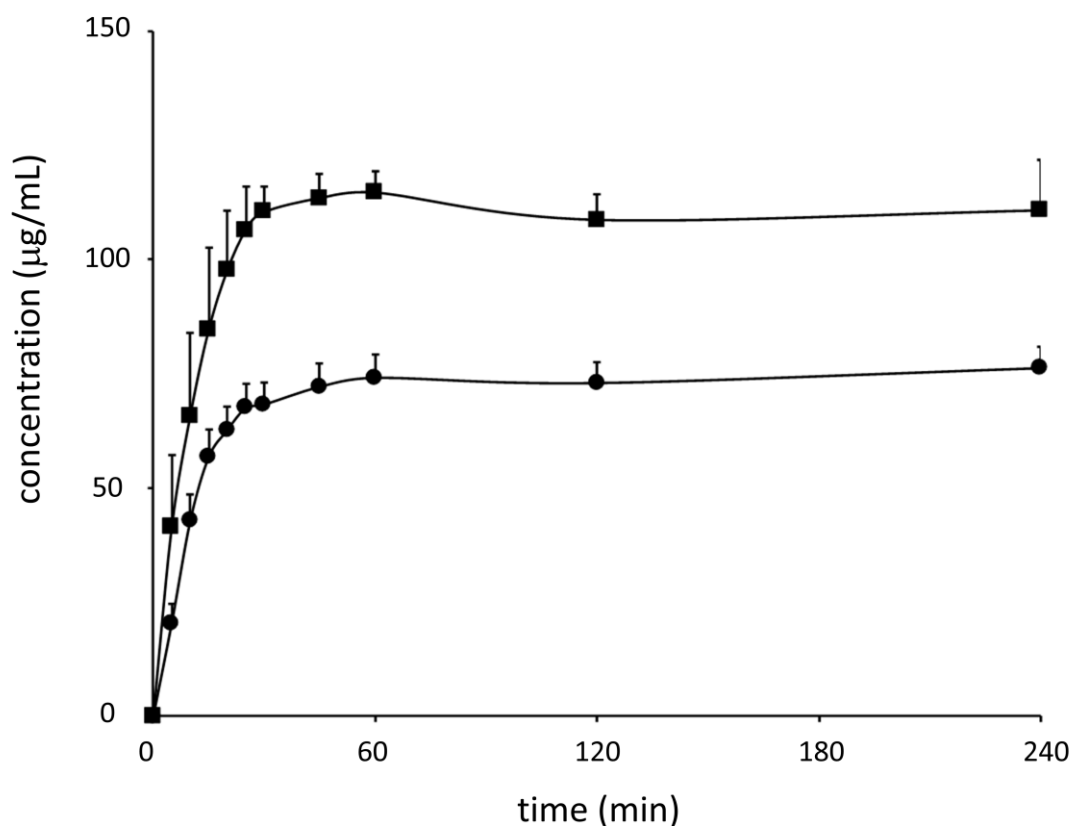


**Figure 12. An overlay diagram comparing each conformer in four different CH5134731 crystals.**

Benzoic acid cocrystal (yellow), benzyl alcohol solvate (cyan), chlorobenzene solvate (magenta), anisole solvate (grey).

### 1.3.7 溶解性評価

Free Form I の FaSSIF 中の溶解度は  $46.5 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$  であった。Figure 13 に示される原薬形態候補であるエタノール溶媒和結晶と安息香酸共結晶の溶出試験結果から、4 h 後の FaSSIF 中の溶液濃度はそれぞれ  $76.2 \pm 4.6 \mu\text{g/mL}$ ,  $110.7 \pm 11.1 \mu\text{g/mL}$  であり、安息香酸共結晶は Free Form I に対して 2 倍以上の溶解性改善効果が認められ、さらにエタノール溶媒和結晶よりも高い溶解性を示した。過去の研究において、コフォーマーの溶解度がフリー体の溶解度より 10 倍以上高い値を示す場合、そのコフォーマーを含む共結晶は溶解性を改善できると報告されている<sup>55)</sup>。安息香酸の溶解度は  $30^\circ\text{C}$  で  $4.033 \text{ mg/mL}$  であり<sup>56)</sup>、フリー体に対して 10 倍以上の溶解度であることから、今回の結果は妥当な結果であると考えられる。溶解性の観点から安息香酸共結晶はもっとも有力な原薬形態と考えられた。



**Figure 13. Dissolution profiles of the benzoic acid cocrystal (■) and ethanol solvate (●) in FaSSIF at 37°C.**

#### 1.4 結論

一般的にコフォーマーとなりうる化合物の個数は膨大であることから、共結晶スクリーニングには多くの時間と化合物量が必要となる。本検討ではフリー体溶媒和結晶の XRPD パターンおよび熱分析結果とそれら溶媒和結晶の溶媒分子の類似性に着目することで、スクリーニングを実施することなく安息香酸共結晶を見出すことに成功した。予想した通り、安息香酸共結晶はベンジルアルコール溶媒和結晶，トルエン溶媒和結晶，クロロベンゼン溶媒和結晶，アニソール溶媒和結晶と類似した XRPD パターンを示した。単結晶構造解析の結果からもこれら結晶が同形構造を持つことが確認され，CH5134731 で囲まれた空間内に安息香酸や溶媒分子が入れかわって存在することで，結晶構造が保持されていた。熱分析の結果から溶媒分子脱離後は結晶構造を保持できないことから空間内に何らかの

分子が存在することは結晶構造を保持する上で重要であり，分子間の相互作用が水素結合ではなかったことも合わせて考えると空間内に存在できる分子の大きさと形状が重要だと推察される．安息香酸共結晶の溶解性は **Free Form I** に対して 2.4 倍程度高く，有力な原薬候補であると考えられる．同形構造を有する有機化合物はいくつか報告されているが，創薬プロセスにおける原薬形態選択にてポジティブに利用された例はほとんどない．通常のコフォーマー選択は化合物間の水素結合パターンや熱力学的な計算によってコフォーマーの優先順位を決めるアプローチか大規模なスクリーニングを実施するアプローチである．前者は分子間の強い相互作用を想定していることから，本研究のように複数の弱い相互作用にて形成される共結晶を見出すことは難しい．また，大規模なスクリーニングを実施することなく共結晶を得てくる本章のようなクリスタルエンジニアリングからのアプローチは短期間かつ少量での検討が求められる創薬研究において今後も重要だと考えられる．

## 2 第2章 Tofogliflozin における塩共結晶の検討

### 2.1 序論

塩結晶や共結晶に加え，塩共結晶は物性改善が可能な新しい分子複合体技術としての可能性があり，原薬形態への適応が期待される<sup>32, 57-59)</sup>．中性分子およびイオン化分子からなる塩共結晶は，塩および共結晶のハイブリッド形態であり，イオン共結晶としても定義される<sup>60, 61)</sup>．つまり医薬品原薬分子が中性化合物であっても酸性・塩基性化合物であっても，物理化学的性質改善のために適応できる技術である．

塩共結晶は3つ以上の成分から構成される複雑な分子複合体であり，具体的には1つの中性成分と塩を形成する2つのイオン化成分から構成され，原薬形態に適応する場合はすべての成分が人にとって安全である必要がある．3成分の塩共結晶は分子間の結合様式から下記の4つの様式に分類される (Figure 14)．

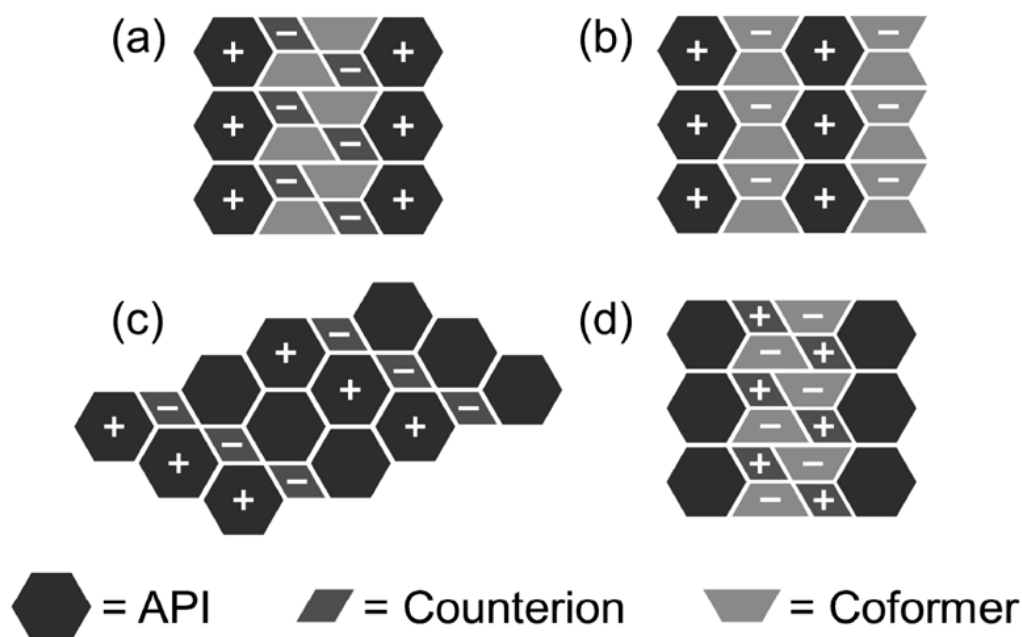


Figure 14. Four type of three component pharmaceutical salt cocrystals

(a) イオン化した原薬分子とそのカウンターイオンがイオン結合にて結合し，さらに中性のコフォーマー分子を格子内に含む様式<sup>32)</sup>

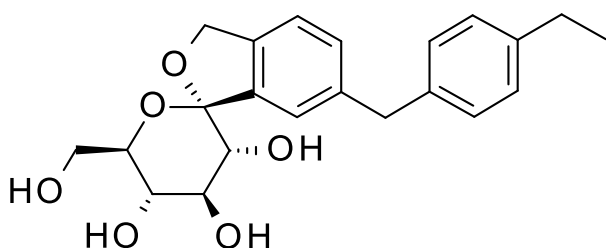
(b) イオン化した原薬分子とイオン化したコフォーマー分子がイオン結合にて結合し、さらに中性のコフォーマー分子を含む様式<sup>62, 63)</sup>

(c) イオン化した原薬とそのカウンターイオンがイオン結合にて結合し、さらにイオン化していない原薬分子を含む様式<sup>58)</sup>

(d) 中性の原薬分子とイオン化したコフォーマー分子とカウンターイオンを含む様式<sup>59, 64)</sup>

(a) , (b) および (c) の場合は原薬がイオン化する必要があるため、酸性もしくは塩基性化合物のみに適応可能であるが、(d) の場合は中性化合物を含めて適応範囲が広がる。また、現在までに上市された医薬品の中に塩共結晶はなく、FDA や EMA においても厳密な定義はされていない。緒言で記載したようにこれまでは原薬がイオン化するかしないかで分子複合体の定義が分かれていたが、FDA の方針転換によりいずれの場合も原薬として取り扱えることになった。塩共結晶は申請や開発の観点でも少しハードルが下がり、今後ますます検討が進んでいく事が期待される。

Tofogliflozin (TFG, Figure 15) は、中外製薬株式会社で II 型糖尿病として創製された SGLT2 (sodium-glucose co-transporter 2) 阻害剤である<sup>65)</sup>。TFG は解離基を持たない化合物であるため、フリー体結晶のスクリーニングに加え、共結晶および塩共結晶のスクリーニングを実施した。2 種の塩共結晶を見出し、単結晶構造解析からの考察と結晶多形の評価を実施した。



**Figure 15. Chemical structure of TFG.**

## 2.2 試料ならびに実験方法

### 2.2.1 試料

TFG は中外製薬株式会社に提供いただき，TFG 水和結晶はアセトン/水混合溶液から蒸発法により取得した<sup>6)</sup>．酢酸ナトリウム (NaOAc) と酢酸カリウム (KOAc) は和光純薬工業から入手した．各種溶媒やその他の物質はそれぞれ化学メーカーから入手した．

### 2.2.2 塩共結晶スクリーニング

スラリー法により TFG 塩結晶のスクリーニングを実施した．先述 (1.2.2 結晶化スクリーニング) と同様の方法により結晶化を行った．結晶化期間は 2 日とし，得られた固体は XRPD を用いて評価した．

Liquid-assisted grinding 法による結晶化も同時に実施した．10 mg の TFG 水和結晶と 10 mg のコフォーマーを 2 mL のプロピレンチューブに秤量後，溶媒を 5  $\mu$ L 加え，卓上型多検体細胞破碎機 (Shake Master NEO, Bio Medical Science) を用いて，1500rpm で 5 min 処理した．用いた溶媒はメタノール，アセトニトリル，アセトン，酢酸エチルである．処理後のサンプルは XRPD にて固体状態を評価した．

### 2.2.3 塩共結晶のスケールアップ

50 mg の TFG 水和結晶と 12 mg の NaOAc または KOAc との混合物にイソプロパノール 1 mL を加え，室温下で懸濁させた．懸濁液に TFG 酢酸ナトリウム共結晶 (TFG-NaOAc) または TFG 酢酸カリウム共結晶 (TFG-KOAc) を種結晶として加え，ロータリーシェイカー (NR-30, TAITEC) を用いて 100rpm で一昼夜攪拌した．

### 2.2.4 XRPD

スクリーニングサンプルについては X 線回折装置 (D8 DISCOVER with GADDS, Bruker AXS) を用いて測定した．X 線源は Cu K $\alpha$ ，0.3 mm コリメーターを用い，検出器は Hi-STAR area detector を使用した．管電圧 45 kV，管電流 40 mA，測定範囲 5–25° 2 $\theta$ ，積算時間 100s の条件で測定した．

スケールアップしたサンプルは全自動水平型多目的 X 線回折装置 (SmartLab, Rigaku)

を用いて測定した。X線はGe(111)モノクロメーターによりCu K $\alpha_1$ に単色化し、検出器には高速1次元検出器(D/teX Ultra, Rigaku)を用いた。管電圧45 kV, 管電流200 mA, 発散スリット1/3°, スキャン速度5°/min, ステップサイズ0.02°, 測定範囲5–35° 2 $\theta$ の条件で測定を行った。温度変調測定は示差走査熱量計(DSC) アタッチメント(Rigaku)を用いた。

#### 2.2.5 単結晶構造解析

測定および解析プログラムは1.2.6を参照。ヒドロキシ基およびヒドロキシメチル基を除く水素原子は幾何学的に配置させ、Ridingモデルを用いて精密化した。ヒドロキシ基およびヒドロキシメチル基部分の水素原子はFourier-difference mapから配置し、等方的に精密化した。

#### 2.2.6 熱分析

示差熱重量同時測定装置(EXSTAR 6200R, SII NanoTechnology)を用いて測定した。アルミニウム製オープン試料容器にサンプルを入れ、窒素気流下、昇温速度10°C/minにて30–350°Cの温度範囲を測定した。

また示差走査熱量計(DSC Q2000, TA Instruments)による測定も実施した。アルミニウム製簡易密封試料容器にサンプルを入れ、簡易密封後、窒素気流下、10°C/minで測定した。加熱冷却サイクル測定時の温度変化も10°C/minで実施した。

#### 2.2.7 水分吸脱着等温線(DVS)測定

動的水蒸気吸着測定装置(DVS INTRINSIC, Surface Measurement Systems)を用い、25°Cで相対湿度0-95%の範囲で測定を行った。質量の平衡基準は、質量変化0.002%/min未満とした。

#### 2.2.8 加熱顕微鏡観察

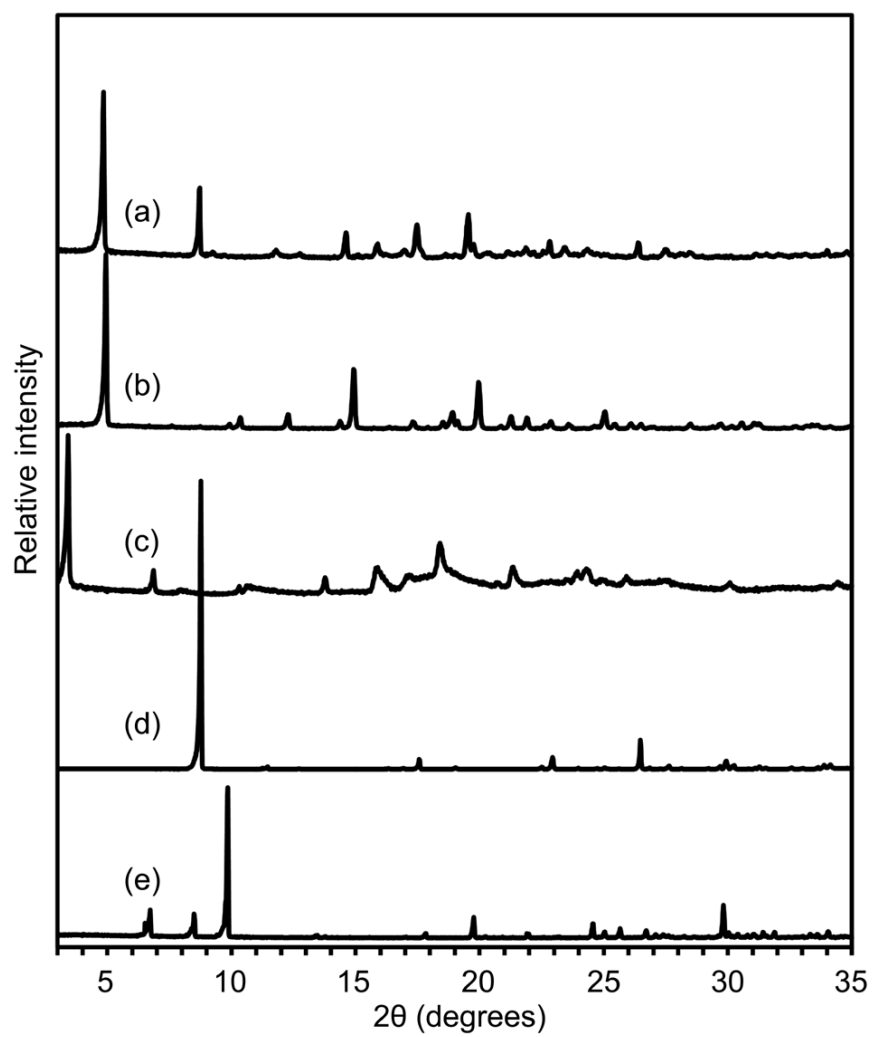
顕微鏡用冷却加熱ステージ(10002, JAOAN HIGH TECH)を用いて、各サンプルを10°C/minの速度で昇温しながら顕微鏡(OPTIPHOT2-POL, NIKON)観察を行った。



## 2.3 結果および考察

### 2.3.1 TFG 塩結晶スクリーニング

スラリー法および Liquid-assisted grinding 法によるスクリーニングの結果，TFG 水和結晶，NaOAc，KOAc のいずれとも異なる XRPD パターンを有する結晶が得られた (Figure 16)．後で詳細に記載するが単結晶構造解析によりこれらの結晶は TFG-NaOAc および TFG-KOAc であると確認された．それぞれのスクリーニングで得られた結果を Table 3，Table 4 にまとめた．スラリー法では複数の溶媒から両塩共結晶は得られ，Liquid-assisted grinding 法はすべての溶媒で両塩共結晶が得られた．スケールアップで得られた結晶の回折パターンとスクリーニングで得られた回折パターンが一致することを確認した．



**Figure 16. XRPD patterns.**

(a) TFG-NaOAc, (b) TFG-KOAc, (c) TFG hydrate, (d) NaOAc and (e) KOAc

**Table 3. Forms obtained in the salt cocrystal screening of TFG using the slurry method**

solvent	coformer	
	NaOAc	KOAc
methanol	—	—
ethanol	NaOAc	—
2-propanol	NaOAc	—
1-butanol	NaOAc	—
acetonitrile	TFG–NaOAc	TFG–KOAc
ethyl acetate	NaOAc	TFG–KOAc
1-propyl acetate	TFG–NaOAc	—
1-butyl acetate	NaOAc	TFG–KOAc
acetone	NaOAc	TFG–KOAc
methyl ethyl ketone	NaOAc	—
methyl isobutyl ketone	NaOAc	TFG–KOAc
<i>tert</i> -butylmethyl ether	NaOAc	—
tetrahydrofuran	NaOAc	—
dichloromethane	NaOAc	—
toluene	NaOAc	TFG–KOAc
water	—	—

**Table 4. Forms obtained in the salt cocrystal screening of TFG using the Liquid-assisted grinding method**

solvent	coformer	
	NaOAc	KOAc
methanol	TFG–NaOAc	TFG–KOAc
acetonitrile	TFG–NaOAc	TFG–KOAc
cetone	TFG–NaOAc	TFG–KOAc
ethyl acetate	TFG–NaOAc	TFG–KOAc

### 2.3.2 TFG 塩共結晶の単結晶構造解析

単結晶構造解析により，TFG–NaOAc および TFG–KOAc はそれぞれ 1:1 の塩共結晶であることが明らかとなった．すなわち，それぞれの結晶構造内には TFG が 1 分子に対して，イオン化した酢酸分子が 1 分子および Na イオンもしくは K イオンが 1 つ存在している．結晶構造パラメータを Table 5 に示す．TFG–NaOAc の空間群は  $P1$  であり，TFG–NaOAc の非対称性単位は TFG，酢酸イオン，Na イオンがそれぞれ 2 分子で構成されていた (Figure 17 (a))．2 つの独立する TFG 分子はほぼ同じコンフォメーションをとっており，酢酸イオンおよび Na イオンに対して類似した配置になっていた．一方，TFG–KOAc の空間群は  $P2_12_12_1$  であった．TFG–KOAc 結晶はそれぞれ 1 分子の TFG，酢酸イオン，K イオンで非対称単位を構成していた (Figure 17 (b))．

TFG–NaOAc の Na イオンは 5 つの酸素原子を介して，1 つの酢酸イオンと 3 つの TFG 分子に配位していた (Figure 18 (a))．また，1 つの酢酸イオンは 2 つの TFG 分子と 3 つの水素結合を形成し，TFG 分子同士はそれぞれのフラン環とヒドロキシメチル基の間で水素結合を形成していた．

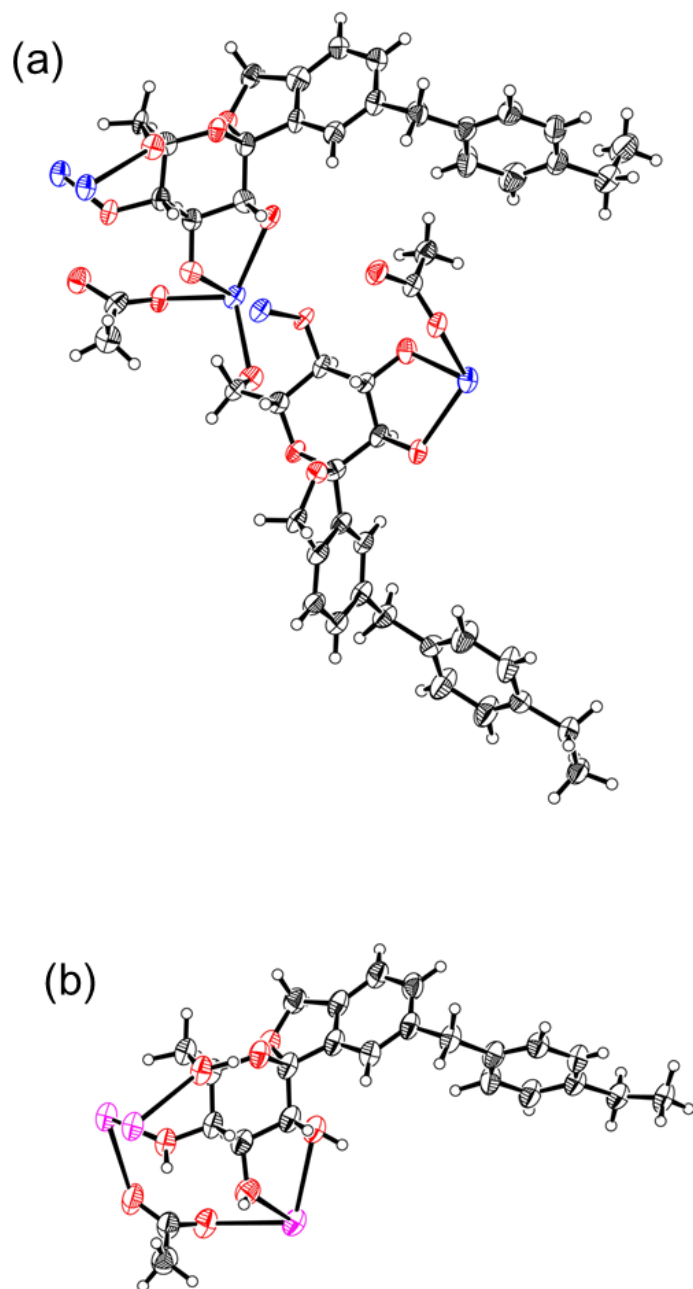
TFG–KOAc と TFG–NaOAc とは異なる空間群および格子定数であるが，TFG–KOAc における TFG 分子の相対配置とコンフォメーションは TFG–NaOAc におけるそれらと類似していた (Figure 18 (b))．しかし，TFG–KOAc の K イオンは 6 つの酸素原子を介して 2 つの酢酸イオンと 3 つの TFG 分子に配位しており，Na イオンもしくは K イオンの配位する数が異なっていた．一方で，両塩結晶ともに TFG 分子間に 1 つの水素結合と，TFG 分

子と酢酸分子間に 3 つの水素結合を有しており、いずれも TFG 分子と酢酸分子は同じ相対的配置であった。

Figure 19 で確認されるように TFG-NaOAc および TFG-KOAc には、いずれも同様のシート状構造を形成していた。イオンへの配位結合と水素結合を形成する TFG のピラン環、酢酸イオン、Na イオンまたは K イオンがシートの中心に位置し、TFG のエチルフェニル基がシートの外側に位置していた。TFG-NaOAc 結晶構造中のシート構造は、同じ向きで  $b$  軸方向に並び、さらにシートが  $a$  軸方向へと積み重なることで結晶構造を形成していた。一方で TFG-KOAc 結晶構造中のシート構造は、交互に逆向きで  $b$  軸方向に並び、さらにシートが  $a$  軸方向へと積み重なることで結晶構造を形成していた。

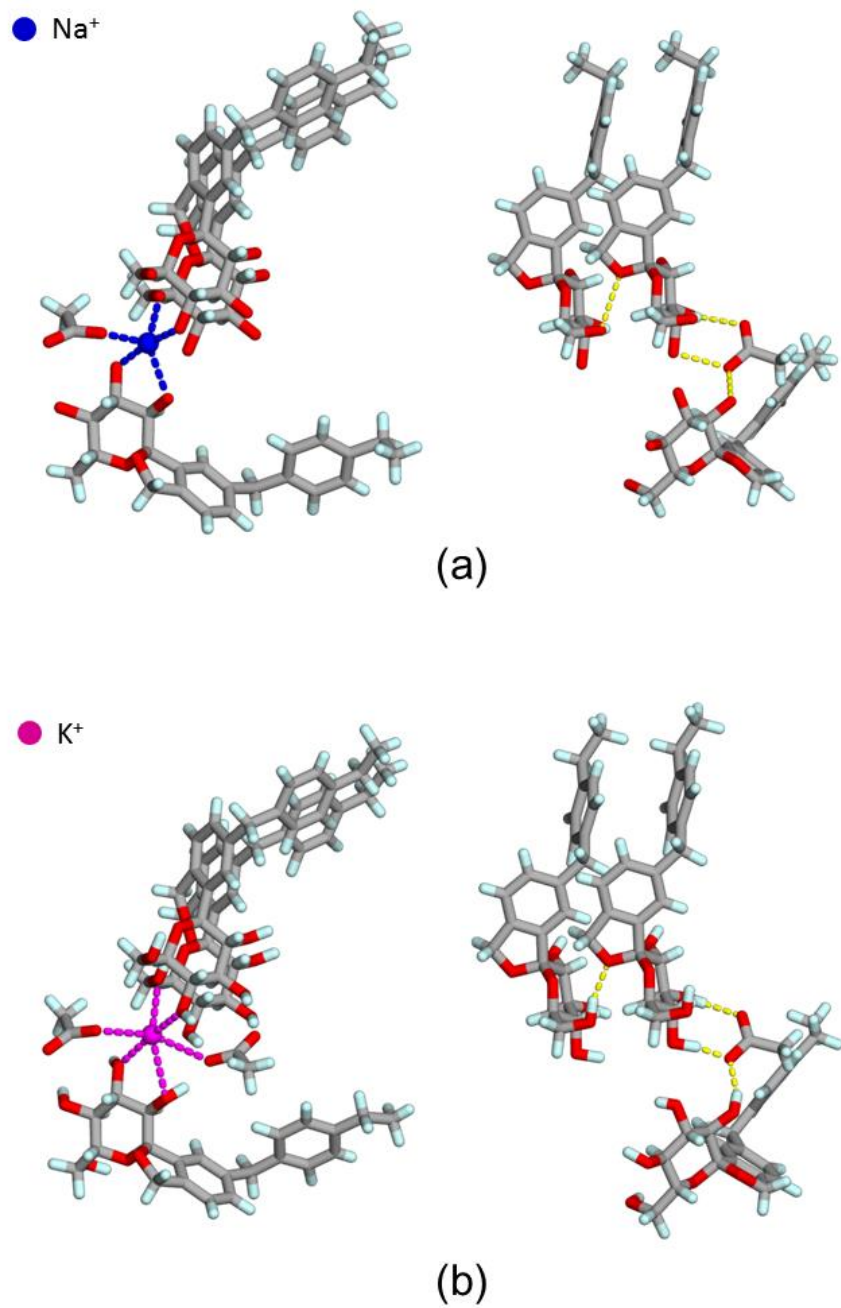
**Table 5. Crystallographic data of TFG–NaOAc and TFG–KOAc**

	TFG–NaOAc	TFG–KOAc
Formula	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NaO <sub>8</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> KO <sub>8</sub>
MW	468.48	484.59
space group	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	5.5714(3)	5.61532(13)
<i>b</i> (Å)	11.6451(6)	12.4115(3)
<i>c</i> (Å)	18.0534(10)	33.7069(11)
$\alpha$ (deg.)	94.715(3)	90
$\beta$ (deg.)	100.560(3)	90
$\gamma$ (deg.)	90.028(3)	90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1147.41(10)	2349.18(11)
<i>Z</i>	2	4
<i>R</i> <sub>1</sub> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	0.0873	0.0595
w <i>R</i> <sub>2</sub> (all data)	0.2085	0.1198



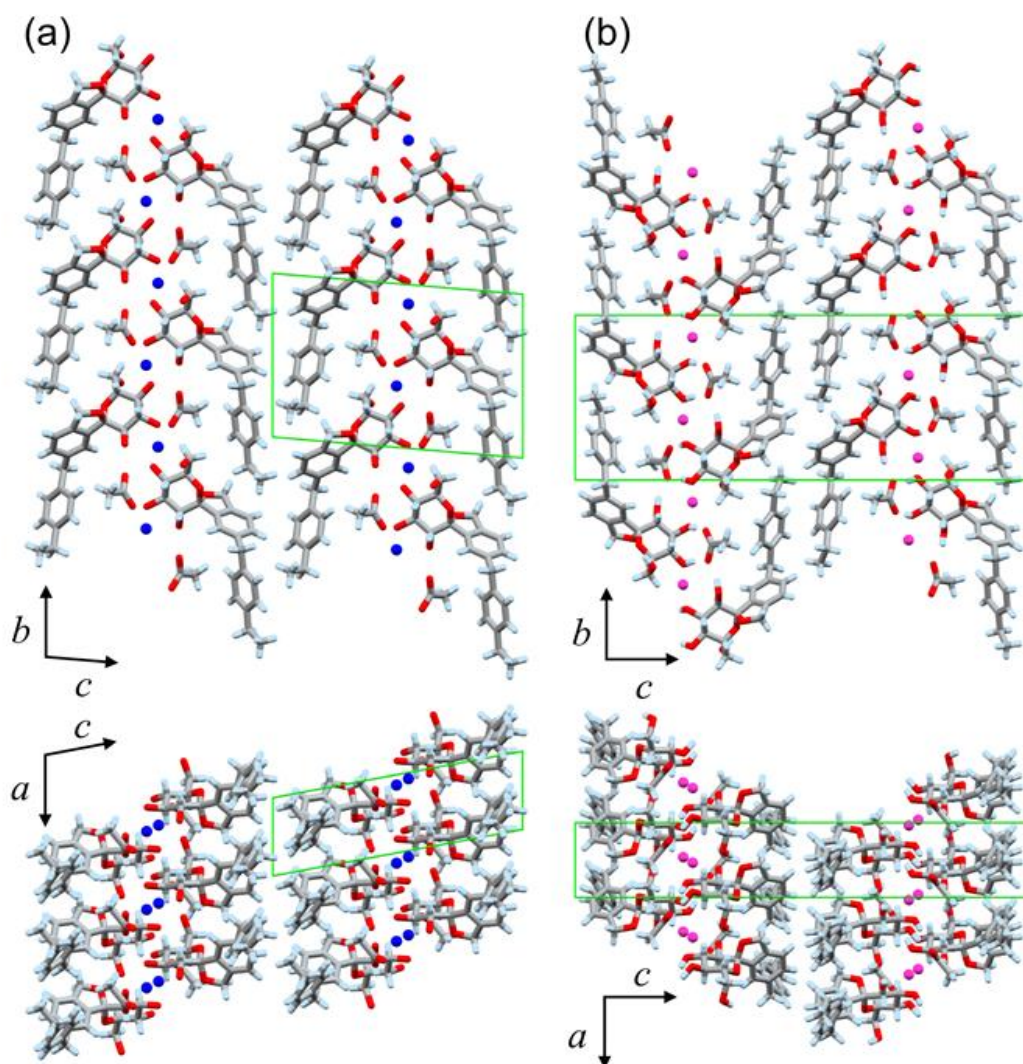
**Figure 17. ORTEP-3 diagrams of the asymmetric units of TFG salt cocrystals.**

(a) TFG–NaOAc and (b) TFG–KOAc, Thermal ellipsoids are shown at the 50% probability level.



**Figure 18. Coordination and hydrogen bonds in (a) TFG-NaOAc and (b) TFG-KOAc**





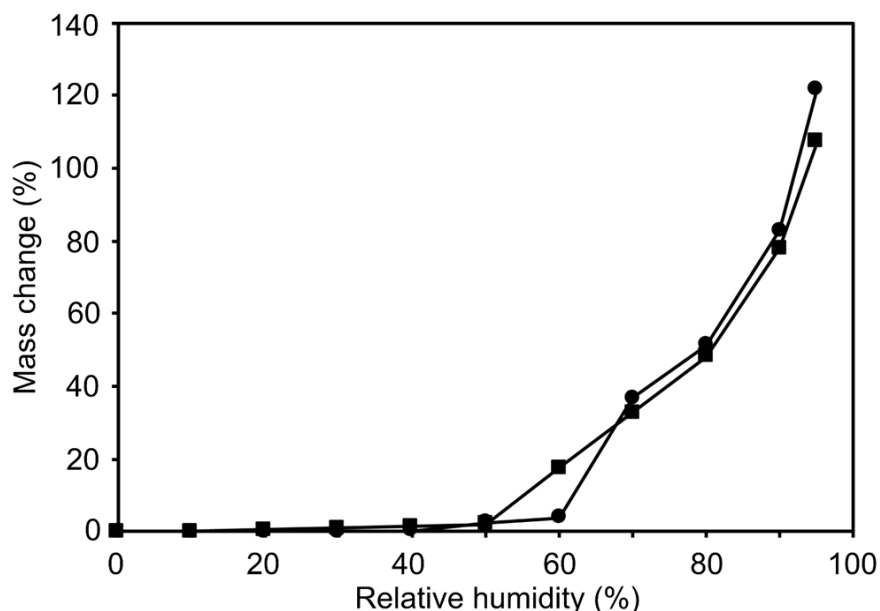
**Figure 19. Packing diagrams as viewed along the  $a$ -axis and  $b$ -axis.**

(a) TFG-NaOAc and (b) TFG-KOAc

### 2.3.3 固体物性評価

両塩共結晶について、吸湿性と熱による固体状態の変化を評価した。DVS 測定の結果を Figure 20 に示す。両塩結晶ともに潮解性を示した。これは TFG 水和結晶には見られない物性である。TFG-NaOAc は徐々に吸湿し、60%RH で約 4%の吸湿量を示した後に潮解した。TFG-KOAc もほぼ同様のプロファイルを示し、50%RH で約 2%の吸湿量を示した後に潮解した。酢酸ナトリウムや酢酸カリウムはそれぞれ 75.8%RH および 23.4%RH で潮

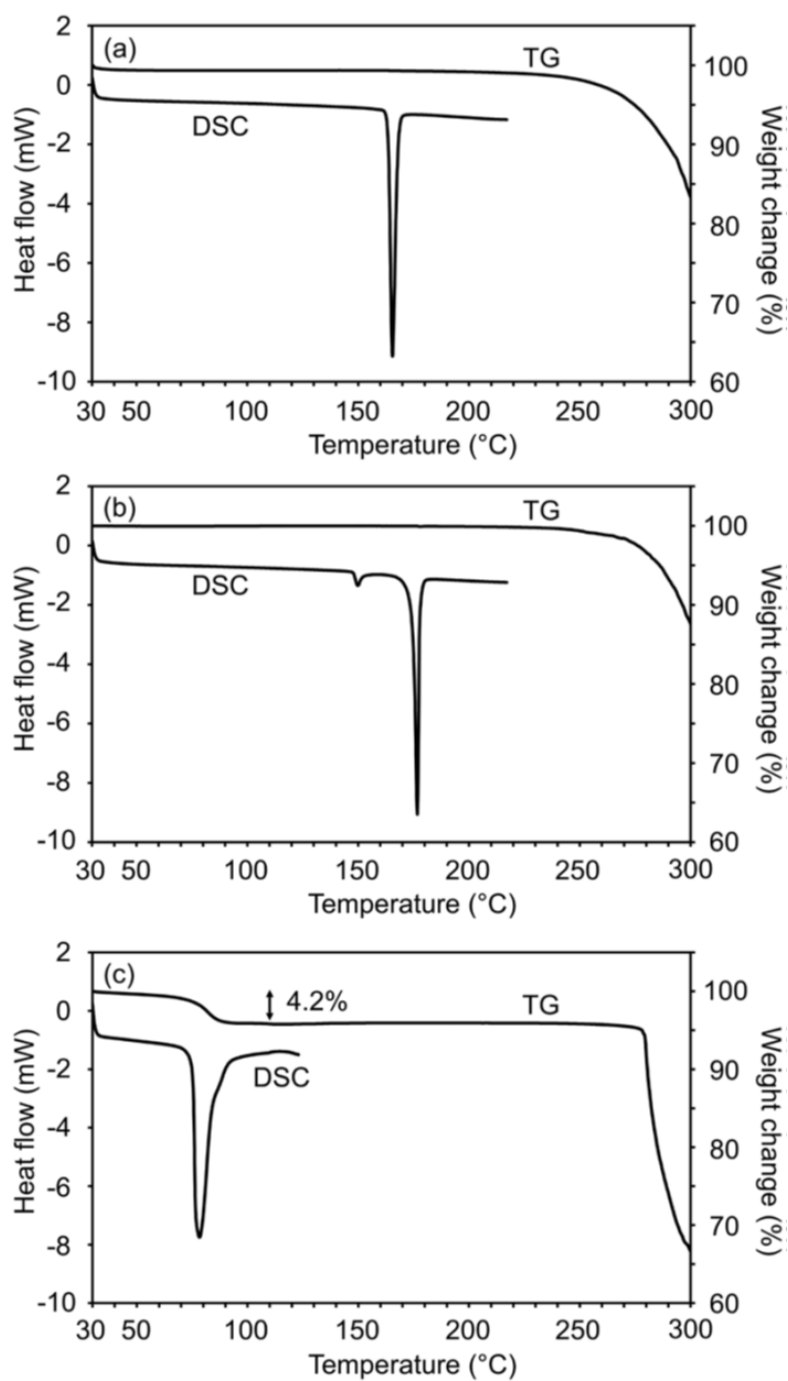
解性を示すことが知られており<sup>67)</sup>, TFG 塩共結晶はこれらを構成要素とするために潮解性を示したと考えられる.



**Figure 20. Water sorption isotherms of TFG-NaOAc (●) and TFG-KOAc (■)**

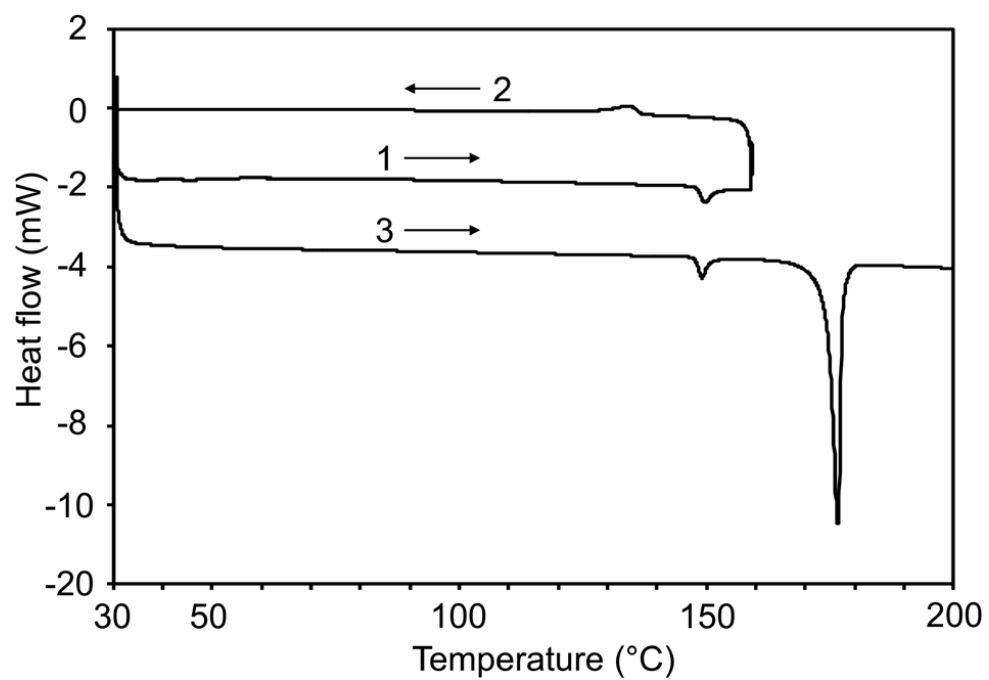
Figure 21 に熱分析結果を示す. 融点に起因すると考えられる吸熱ピークがそれぞれの結晶で確認でき, TFG-NaOAc は 164°C, TFG-KOAc は 175°C, TFG 水和結晶は 75°C であった. これらが融点であることは加熱顕微鏡観察により確認した. 両塩結晶は融解前に重量減少を示しておらず, 非溶媒和結晶であるという単結晶構造解析の結果を支持した. 一方, TFG 水和結晶は 110°C で約 1 水和水に相当する 4.2%の重量減少を示した. TFG-KOAc においては融解前の 148°C に吸熱ピークが認められた. 転移熱則に基づくと<sup>68)</sup>, この吸熱ピークを境とし低温安定形から高温安定形に転移していると考えられる. すなわち, TFG-KOAc には互変形の関係にある結晶多形が存在する可能性がある. このことを確認するため温度サイクルによる DSC 測定と各温度における XRPD 測定を実施した. 昇温過程では 150°C 付近に吸熱ピークを, また降温過程では 135 °C 付近に発熱ピークを確認できた (Figure 22) ことから, TFG-KOAc には互変形の関係にある結晶多形が存在するとわかった. さらに 30 °C から 160°C の加熱冷却サイクルに伴う TFG-KOAc の XRPD パ

ターンの変化を測定したところ、転移点を境にした可逆的な XRPD パターンの変化が確認された (Figure 23)。これは互変形に典型的な熱的挙動の一つである。結晶原薬においては、フリー体だけでなく塩結晶も共結晶も結晶多形を有する<sup>69-72)</sup>。結晶多形を持つ共結晶は多く報告されており、その中には互変形の関係にある多形を持つ事例も含まれている<sup>73-78)</sup>。本事例は塩共結晶も他の結晶と同じく結晶多形が存在することを示している。

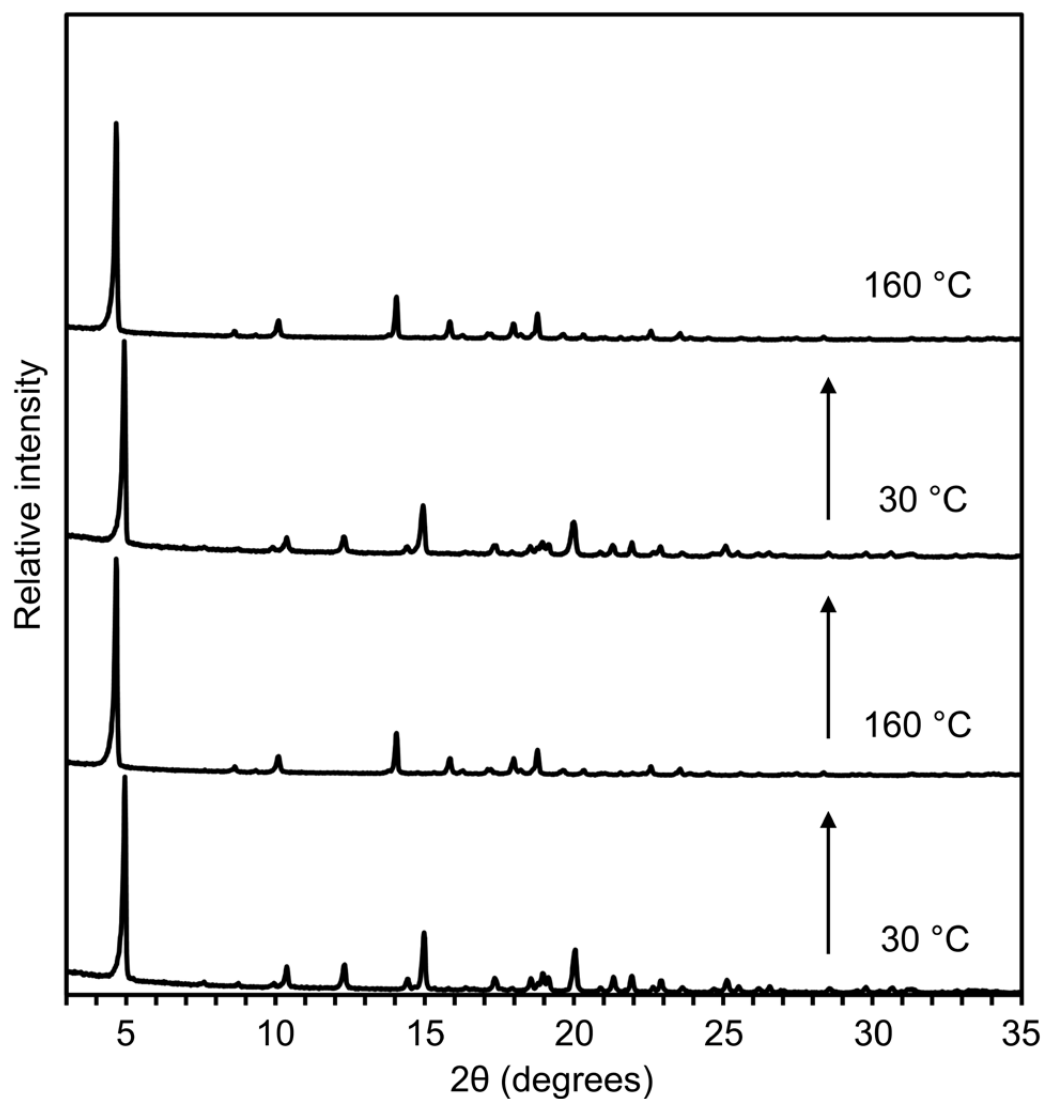


**Figure 21. TGA and DSC Thermograms.**

(a) TFG-NaOAc, (b) TFG-KOAc, and (c) TFG hydrate



**Figure 22. DSC thermogram of TFG-KOAc obtained in a heat-cool-heat cycle measurement**



**Figure 23. XRPD patterns of TFG-KOAc at 30 and 160°C**

## 2.4 結論

塩共結晶は3成分の分子複合体である。報告事例は少ないが、本章ではTFGについて、医薬品として許容されるコフォーマーを用いた2つの塩共結晶を見出した。これら塩共結晶について分析・解析を進めたところ2つの興味深い物性が確認された。

1つは潮解性である。TFG水和結晶には潮解性は認められていないが、両塩共結晶には潮解性が確認された。コフォーマーであるNaOAcやKOAcが潮解性を示す事が確認され

ており、本性質が塩共結晶にも反映されたものと考えられるが、一般論として考えてよいかは今後の検討課題であり、これらコフォーマーを含む他の塩共結晶について確認する予定である。もし、TFG-NaOAc, TFG-KOAc を原薬形態として選択し開発するためには製造時や保管時に湿度コントロールが必要となる。

2 つめは多形である。TFG-KOAc については 2 つの結晶多形が確認され、それらは互変形の関係にあることがわかった。医薬品原薬が結晶である場合、フリー体、塩、共結晶で多形を示す。塩共結晶でもこれらと同じく多形を示す事が確認され、従来の結晶と同じく申請時には多形検討および報告が必要になると考えられる。TFG-KOAc の転移点は室温よりも高く、熱力学的な観点からは低温安定形での開発が可能と判断される。

本章で述べた TFG-NaOAc, TFG-KOAc は医薬品分子と有機塩のコフォーマーによる複合体である。これまで報告されている医薬品分子がイオン化するタイプでも無機塩との複合体でもなく、新しいタイプの塩共結晶であり今後のさらなる展開が期待される。

### 3 第3章 ウルソデオキシコール酸を用いたアモルファス非臨床製剤の開発

#### 3.1 序論

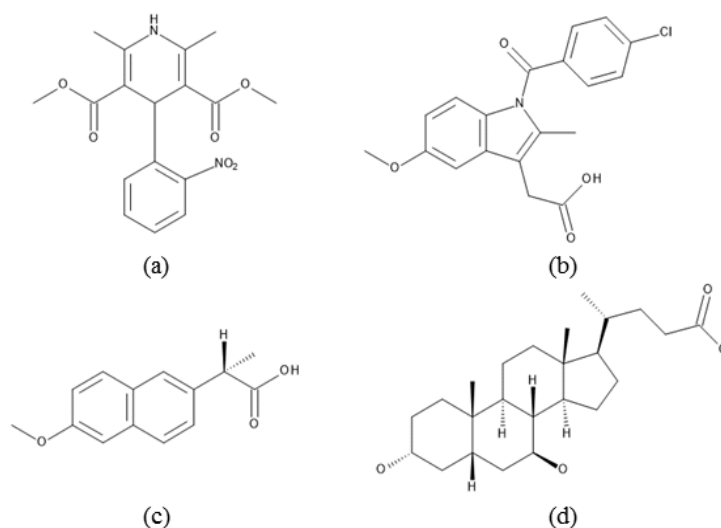
創薬プロセスにおける化合物の最適化や前臨床段階で実施される毒性試験では高い暴露を得る必要がある。しかしながら、難水溶性化合物で高暴露を得ることは非常に難しく、多くの検討が必要となる<sup>79-81)</sup>。非臨床製剤としては主に2つのアプローチによる検討を実施する。1つめは有機溶媒や界面活性剤を用いた溶液製剤である。しかしながら、毒性試験は長期に渡る試験であり、動物に対するそれら基材の安全性の観点から、使用できる種類や量に制限がある<sup>79-81)</sup>。加えて、緒言で述べたように有機溶媒や界面活性剤による溶解性改善製剤は *solubility-permeability interplay* の観点<sup>4-7)</sup>から膜透過に影響があるため、必ずしも期待した暴露が得られるとは限らない。2つめは塩結晶や共結晶、アモルファスといった原薬形態の検討である。これらは過飽和を生じさせることで溶解性の改善が可能であるが、一般的に動物への投与は水を媒体とした懸濁液を用いるため、投与媒体中で溶媒媒介転移により溶解度がより低いフリー体結晶等に転移してしまう可能性や均一な懸濁液にならないなど非臨床製剤としての特有の課題がある。

アモルファス状態は結晶状態よりも高い自由エネルギー状態であるため、原薬の非晶質化は溶解性改善が可能な一つの手法である。しかし、その高い自由エネルギーのため、保存時により安定な結晶状態に転移してしまう懸念があり<sup>17)</sup>、ピュアなアモルファスを原薬形態とすることは非常にまれである<sup>8)</sup>。そのため、より高い物理化学的安定性を得ることを目的とし、アモルファス固体分散体の検討が広くなされている<sup>18)</sup>。固体中で原薬分子と親水性ポリマーが相互作用することで原薬分子同士の相互作用を抑制することがそのメカニズムであり、水中での溶解時もポリマーが結晶化を阻害することで過飽和を維持できることが期待される。一般的なアモルファス固体分散体は *thermodynamic solubility* を改善するのではないため、*solubility-permeability interplay* の観点からは膜透過に影響を及ぼさず、溶解性の改善が吸収の改善につながる<sup>82)</sup>。例えば、難水溶性薬物であるニフェジピン (NIF) はアモルファスから容易に結晶へと転移することが知られており<sup>83)</sup>、固体分散体に関する研究が複数なされている<sup>17, 83)</sup>。



最近では co-amorphous と呼ばれるアモルファスの安定化のための新しいアプローチが報告されている<sup>84-86)</sup>。低分子同士の相互作用を利用している点が従来のポリマーを利用する方法と異なる点であり、系内に2つの原薬を含むタイプと1つの原薬と1つの添加剤を含むタイプに分かれる。しかしながら、前者は合剤のような限られた範囲での適応に限られ、新薬を開発する企業にとっては後者の方が魅力的な手法であり、これまでも溶解度、溶解速度、物理安定性等を改善した報告がなされている<sup>87,88)</sup>。原薬と添加剤によって非晶質を安定化させる技術をより広めるためには、製造プロセスやレギュレーションを意識した検討が今後重要になる<sup>85)</sup>。例えば、co-amorphous に関する多くの報告では添加剤がアミノ酸であり、製造方法はボールミルを選択している<sup>89-91)</sup>。一般的には、ホットメルトエクストルーダーやスプレードライを用いた方法が均一なアモルファスを得る工業的な手法である。ボールミルは少量サンプルの検討では有用な方法であるが、大量調製においては均一に調製することが難しいためである。さらに、アミノ酸は融点が高く、揮発性溶媒への溶解度が極めて低いため、スプレードライを用いた調製に難があり、工業プロセスの観点で課題が多い。

ウルソデオキシコール酸 (UDCA, Figure 24 (d)) は胆汁酸の成分の一つであり、その物性化学特性<sup>92)</sup>やコール酸 (CA) と同じく包摂結晶体を形成することが報告されている<sup>92,93)</sup>。さらに UDCA のアモルファスの調製や物性評価についての研究もなされている<sup>94-96)</sup>。しかしながら、それら特性を利用し UDCA を製剤化に利用した研究はほとんどされていない。本章では UDCA を用いたアモルファス非臨床製剤の開発について記述する。インドメタシン (IND, Figure 24 (b)), ナプロキセン (NAP, Figure 24 (c)), ニフェジピン (NIF, Figure 24 (d)) は BCS クラス II の化合物として知られており<sup>97,98)</sup>、これらをモデル化合物とした検討を行った。



**Figure 24. Chemical structures of model compounds**

(a) nifedipine (NIF), (b) indomethacin (IND), (c) naproxen (NAP), and (d) ursodeoxycholic acid (UDCA).

## 3.2 試料ならびに実験方法

### 3.2.1 試料

IND, NAP, NIF および UDCA は和光純薬工業から入手した。PVP は BASF Japan に提供いただき、メチルセルロース (MC) は信越化学工業から入手した。各種溶媒やその他の物質はそれぞれ化学メーカーから入手した。

### 3.2.2 Solvent casting 法を用いたスクリーニング

NIF と UDCA を含むエタノール溶液を調製した。NIF 濃度は 50 mg/mL で一定とし、UDCA の濃度を変えた溶液を 4 種類 (モル比 NIF : UDCA = 1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5) 調製した。同様に IND と UDCA を含んだエタノール溶液および NAP と UDCA を含んだエタノール溶液を調製した。それぞれのエタノール溶液 120  $\mu$ L をホットプレート (C-MAG HS4, IKA) で 60°C に熱したガラスプレート上に滴下し、乾燥サンプルを得た。得られたサンプルを 25°C/0%RH および 40°C/75%RH で 1, 3, 7 日間保存した。乾燥直後のサンプルと保存後のサンプルは XRPD により評価した。

### 3.2.3 スプレードライによるアモルファスのサンプル調製

NIF と UDCA を含むエタノール/水 (1 : 1) 溶液を調製した. NIF 濃度は 2 mg/mL とし NIF と UDCA の比率はモル比で 1 : 2 とした. 同様に IND と UDCA, NAP と UDCA を含んだエタノール/水 (1 : 1) 溶液も調製した. 調製したエタノール/水 (1 : 1) 溶液はスプレードライヤー (B-290, Büchi) を用いて乾燥させた. 乾燥条件は以下の通りである.

Inlet temperature : 110°C

溶液の投入速度 : 6 mL/min

窒素流量 : 7.5 m<sup>3</sup>/h

また NIF と PVP を含むエタノール溶液を調製した. NIF 濃度は 33 mg/mL とし NIF と PVP の比率は重量比で 1 : 2 とした. 溶液は 60°C で調製し, スプレードライヤー (B-290, Büchi) を用いて乾燥させた. 乾燥中は溶液温度を室温としていたが乾燥終了まで析出物が無いことを確認した. 乾燥条件は以下の通りである. 得られたサンプルは真空乾燥機 (VT220 vacuum dryer, Kusumoto Chemicals) にて 2 次乾燥を行った.

Inlet temperature : 70°C

溶液の投入速度 : 6 mL/min

窒素流量 : 7.5 m<sup>3</sup>/h

### 3.2.4 懸濁液の調製

ビーカーに 5 g の MC を測りとり, 水 500 mL を加えて溶解させ, 1% MC 水溶液を調製した. スプレードライにより調製したサンプルをそれぞれ 20 mg ずつバイアルに測りとり, 1% MC 水溶液を 0.4 mL 加え 50 mg/mL の懸濁液とした. 分散性を良くするために各懸濁液を超音波バスで処理した. XRPD や Raman 測定のため, それぞれの懸濁液からステンレスメッシュ (特注品, Sankeishoji) を用いて, 粒子を取り出し測定用サンプルとした.

### 3.2.5 溶解度測定

1%MC 水溶液中の NIF 濃度は HPLC を用いて測定した. サンプルは懸濁液を遠心フィ

ルター（PTFE 0.2  $\mu\text{m}$ , ULTRAFREE-MC-LG, Millipore）で処理することで取得し，N,N-dimethylacetamide（DMA）で倍希釈した．HPLC 条件は以下のとおりである．

装置：Waters 製 HPLC（Waters 2795 separation module and Waters 2487 dual  $\lambda$  UV/vis detector）

カラム：Cadenza CD-C18, 3 $\mu\text{m}$ , 3.0 $\times$ 50 mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

流速：1 mL/min

移動相：0.1%TFA-water, 0.1%TFA-acetonitrile

移動相条件：Gradient

(0-1.5 min with 60% acetonitrile, 1.51-3 min with 95% acetonitrile)

検出波長：235 nm

### 3.2.6 物理安定性評価

スプレードライで調製した NIF-UDCA と NIF-PVP を温度が 25 および 40 $^{\circ}\text{C}$  の 2 水準，湿度が 0%，75%，100%RH の 3 水準，合計 6 つの条件で 4 週間保存した．保存後のサンプルは XRPD で評価した．

### 3.2.7 分子体積

IND, NAP および NIF の分子モデルは ConQuest version 1.19（Cambridge Crystallographic Data Centre）を用いて，単結晶構造データ（INDMET<sup>99</sup>），COYRUD<sup>100</sup>および BICCIZ<sup>101</sup>）から得た．得られたモデルを使用して Discovery Studio Client version 17.2（BIOVIA）を使用して分子体積を計算した．

### 3.2.8 XRPD

XRPD データはデスクトップ型 X 線回折装置（MiniFlex600, Rigaku）を用いて測定した．X 線源は Cu K $\alpha$ ，スキャン速度 5 $^{\circ}$ /min，ステップサイズ 0.04 $^{\circ}$ ，測定範囲 5–30 $^{\circ}$  2 $\theta$  の条件で測定を行った．

### 3.2.9 温度変調示差走査熱量計 (mDSC) によるガラス転移点の測定

ガラス転移点 ( $T_g$ ) の測定は温度変調 DSC (Q2000 modulated DSC, TA Instrument) を用いて行った。サンプルはアルミニウム容器に入れ、簡易密封し、200°C まで昇温速度 5°C/min, 変調周期 60 s, 変調幅 $\pm 1.00^\circ\text{C}$ , 窒素流量 50 mL/min の条件で測定を行った。得られた  $T_g$  は Gordon-Taylor の式<sup>102)</sup>で得られる理想的な  $T_g$  と比較を行った。

$$T_g = (\omega_1 T_{g_1} + K \omega_2 T_{g_2}) / (\omega_1 + K \omega_2)$$

$$K = T_{g_1} \rho_1 / T_{g_2} \rho_2$$

$\omega$  は重量分率である。 $T_g$  はガラス転移点であり NIF は  $42^\circ\text{C}^{17)}$ , UDCA は  $100^\circ\text{C}^{96)}$  とした。また,  $\rho$  は密度を表し, NIF は  $1.378 \text{ g/cm}^3$ , UDCA は  $1.198 \text{ g/cm}^3$  という計算結果を単結晶構造データ (BICCI, FEBHUP<sup>103)</sup>) から Mercury (Cambridge Crystallographic Data Centre) により得た。

### 3.2.10 ラマン分光

ラマンスペクトルは顕微ラマン (RamanRxn analyzer, Kaiser Optical System) を用いて取得した。測定条件は以下の通りである。

励起波長 : 785 nm

スポットサイズ : 約 50  $\mu\text{m}$  (10 倍の対物レンズを使用)

露光時間 : 1s

積算回数 : 4 回

### 3.2.11 DVS

2.2.7 を参照。

### 3.2.12 電界放出型電子顕微鏡 (FE-SEM)

粒子形状を確認するため FE-SEM (SU8010, Hitachi High Technologies) を用いた観察を行った。サンプルはアルミニウム製試料台に両面テープで固定し、イオンコーター (E-1045 ion sputter coater, Hitachi High Technologies) を用いて白金粒子を約 3 nm の厚さで蒸

着した。観察時の加速電圧は 1.0 kV とし、二次電子と反射電子から FE-SEM 画像を取得した。

### 3.3 結果および考察

#### 3.3.1 スクリーニング結果

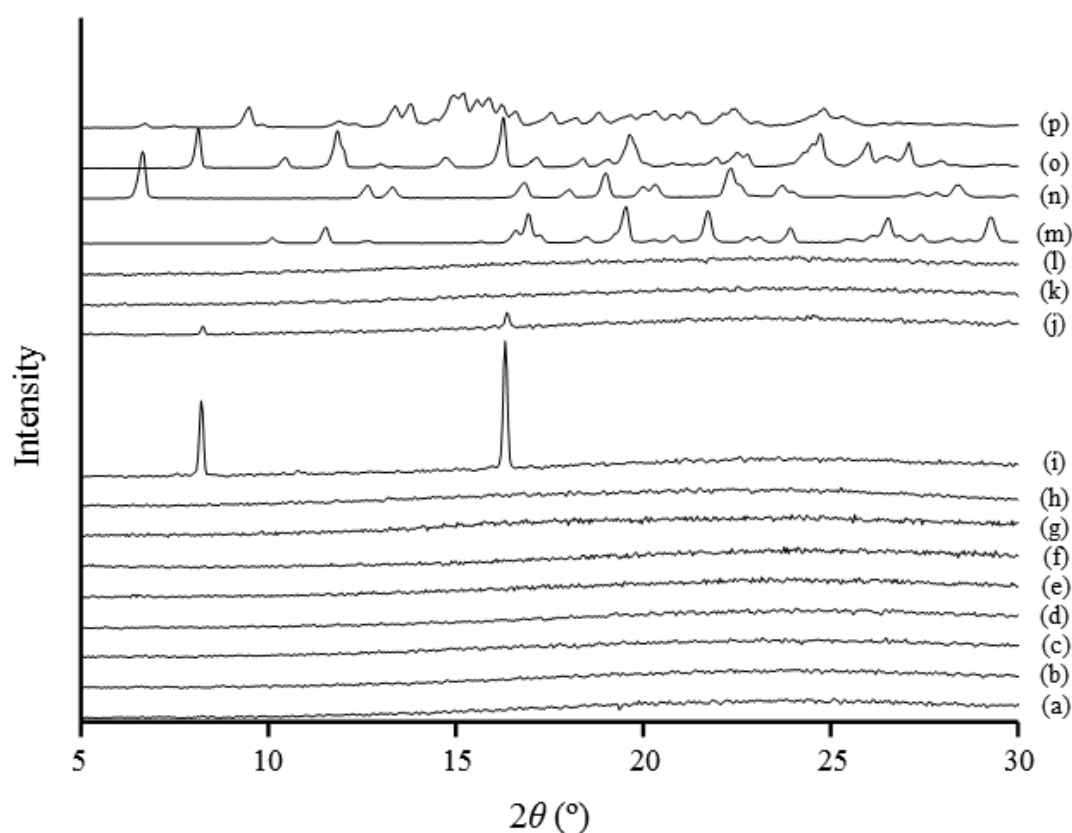
Solvent casting 法で調製した NIF-UDCA, IND-UDCA および NAP-UDCA の調製直後の XRPD パターンを Figure 25 に示す。NIF-UDCA (2:1) と NIF-UDCA (1:1)以外のサンプルでは結晶に起因する回折ピークは認められず、アモルファスが調製できている事が確認できた。NIF-UDCA (2:1) と NIF-UDCA (1:1)で認められた回折ピークは NIF に起因するものであり、UDCA 由来の回折ピークは認められなかった。これらサンプルを 40°C/0%RH および 40°C/75%RH で保存後、XRPD で測定し物理状態を評価した結果を Table 6 にまとめた。IND, NAP および NIF はポリマー等の添加剤が存在しないとすぐに結晶化してしまうが、それらの結晶化は UDCA によって阻害されていると考えられる。

IND-UDCA については 25°C /0%RH であれば 3 日間アモルファス状態を保持したが、40°C /100%RH では IND および UDCA 由来の結晶性のピークが認められた。

NAP-UDCA は、NAP に対する UDCA のモル比が低い際にはすぐに NAP が結晶化した。1 日目の測定では UDCA の回折ピークは認められておらず、3 日目では NAP および UDCA の回折ピークが認められている。この事は調製直後の段階もしくは1 日目の時点で NAP と UDCA が相分離していることを示唆している。モル比 1 : 2 の場合は両条件下で 1 日間安定であった。

一方、NIF-UDCA はモル比 1 : 2 の際には 3 日間安定であったが、モル比 1 : 5 で調製したサンプルは 1 日後に NIF および UDCA の結晶が認められた。通常のポリマーを用いた固体分散体による低分子化合物の非晶質の安定化では、キャリアであるポリマー比率が高ければ高いほど、物理的な安定性を得ることができる<sup>18)</sup>。しかし構成成分がどちらも結晶化してしまうアモルファス複合体では、一方の化合物が結晶化すると結晶化の誘発が生じ、系が崩れてしまうと考えられる。本研究の事例ではアモルファス複合体形成に必要が無い、余剰分の UDCA が始めに結晶化したと推察される。その UDCA 結晶がアモルファス複合体中に種として存在してしまい、複合体を形成し NIF と相互作用している UDCA も誘発され結晶化したことで、NIF も結晶化してしまったと考えられる。

UDCA を用いたアモルファス製剤においては、原薬と UDCA の最適な比率をスクリーニングによって見出すことが重要であることがわかった。本章で用いた Solvent casting 法は少量かつ短期間で最適な比率を見出すことが可能であり、特に原薬の使用量に制限がある Pre-clinical ステージ以前に行うスクリーニング方法として適していると考えられる。また、揮発性有機溶媒を蒸発させることでサンプルを調製する方法であり、大量調製時には同じメカニズムのスプレードライにスムーズに移行できることも利点の一つである。



**Figure 25. Initial XRPD patterns obtained from solvent casting**

(a) IND–UDCA, 2:1; (b) IND–UDCA, 1:1; (c) IND–UDCA, 1:2; (d) IND–UDCA, 1:5; (e) NAP–UDCA, 2:1; (f) NAP–UDCA, 1:1; (g) NAP–UDCA, 1:2; (h) NAP–UDCA, 1:5; (i) NIF–UDCA, 2:1; (j) NIF–UDCA, 1:1; (k) NIF–UDCA, 1:2; (l) NIF–UDCA, 1:5; (m) IND crystal; (n) NAP crystal; (o) NIF crystal; (p) UDCA crystal.

**Table 6. Summary of physical stability of amorphous composites prepared by solvent casting**

Samples	Ratio	Initial	Stability conditions			
			1 day		3 days	
			0% RH at 25°C	100% RH at 40°C	0% RH at 25°C	100% RH at 40°C
IND-UDCA	1:0.5	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous	IND, UDCA
	1:1	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous	IND, UDCA
	1:2	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous	IND, UDCA
	1:5	amorphous	-	-	-	-
NAP-UDCA	1:0.5	amorphous	NAP	NAP	NAP, UDCA	NAP, UDCA
	1:1	amorphous	NAP	NAP	NAP, UDCA	NAP, UDCA
	1:2	amorphous	amorphous	amorphous	NAP	NAP, UDCA
	1:5	amorphous	-	-	-	-
NIF-UDCA	1:0.5	NIF	-	-	-	-
	1:1	NIF	-	-	-	-
	1:2	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous
	1:5	amorphous	NIF, UDCA	NIF, UDCA	-	-

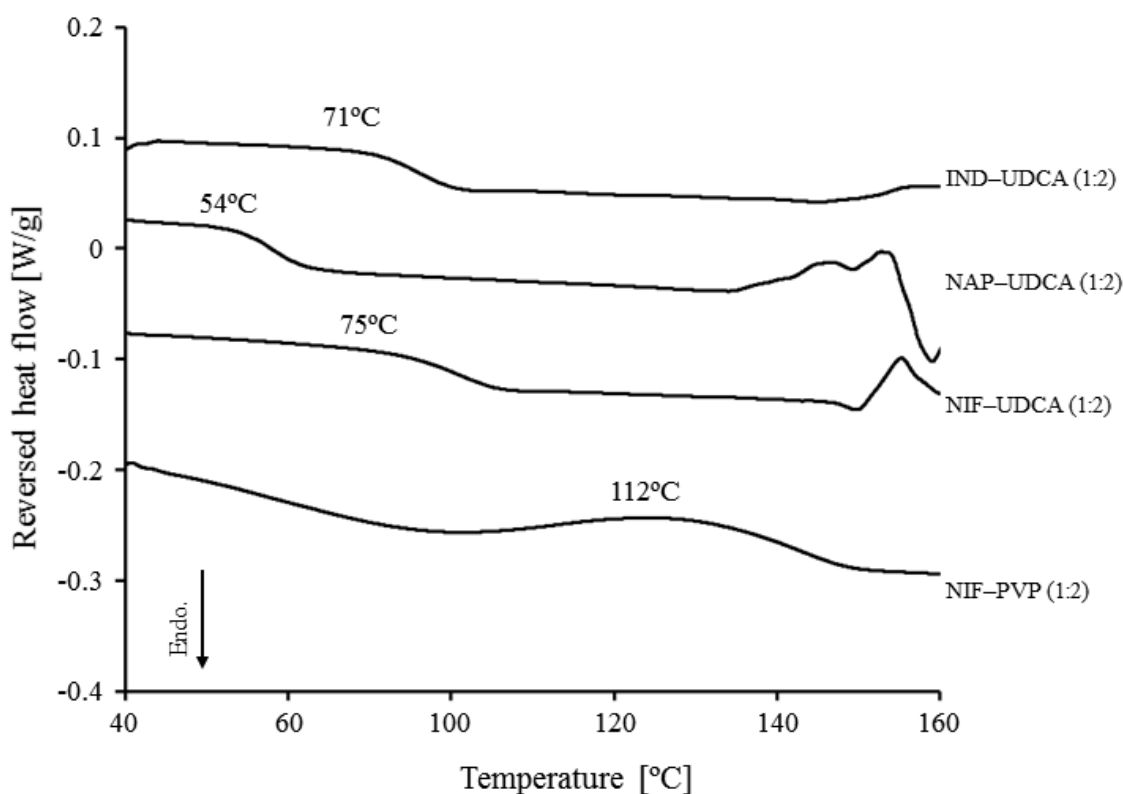
### 3.3.2 スプレードライで調製したサンプルの固体物性評価

原薬および UDCA のモル比を 1 : 2 とし IND-UDCA, NAP-UDCA および NIF-UDCA をスプレードライにて調製した. NIF および UDCA の分子量はそれぞれ 346.3, 392.5 g/mol であり重量比はおおよそ 1 : 2 となる. 同じく NIF-PVP を重量比 1 : 2 にてスプレードライで調製し, 従来のポリマーを用いたアモルファス複合体と比較することとした. すべてのサンプルは非晶質である事を XRPD で確認し, mDSC の結果 (Figure 26) よりガラス転移点が一つであることから単一相のアモルファス複合体が調製できている事を確認した. これらの事から UDCA をキャリアとしたアモルファス複合体の調製は成功したと判断される.

UDCA や CA はそれら分子が結晶構造中でフレームワークを形成することで別の分子 (コフォーマー) を取り込み, 結晶複合体 (共結晶) を形成することが知られている. これらフレームワークは周期性を持ったものであり, もし調製したサンプルにおいて IND, NAP, NIF らがこのフレームワーク内に存在している場合は XRPD にて回折ピークが現れ



る．つまりこれまで報告されている UDCA 複合体の様式とは異なった形態になっていると考えられる．さらに CA 共結晶ではコフォーマーの分子サイズに制限があり，その大きさは  $220 \text{ \AA}^3$  以下であること<sup>104)</sup>，UDCA のフレームワークで形成される空間はより自由度が低いことが報告されている<sup>93)</sup>．IND, NAP, NIF の分子体積の計算結果は 272, 187,  $269 \text{ \AA}^3$  であった．本研究で見出した UDCA アモルファス複合体は複合体形成可能な分子サイズの幅がより広いことが明らかとなった．これはターゲットに合わせて様々な分子が創製される創薬研究においては有用な物性である．



**Figure 26. Thermal profiles obtained by mDSC.**

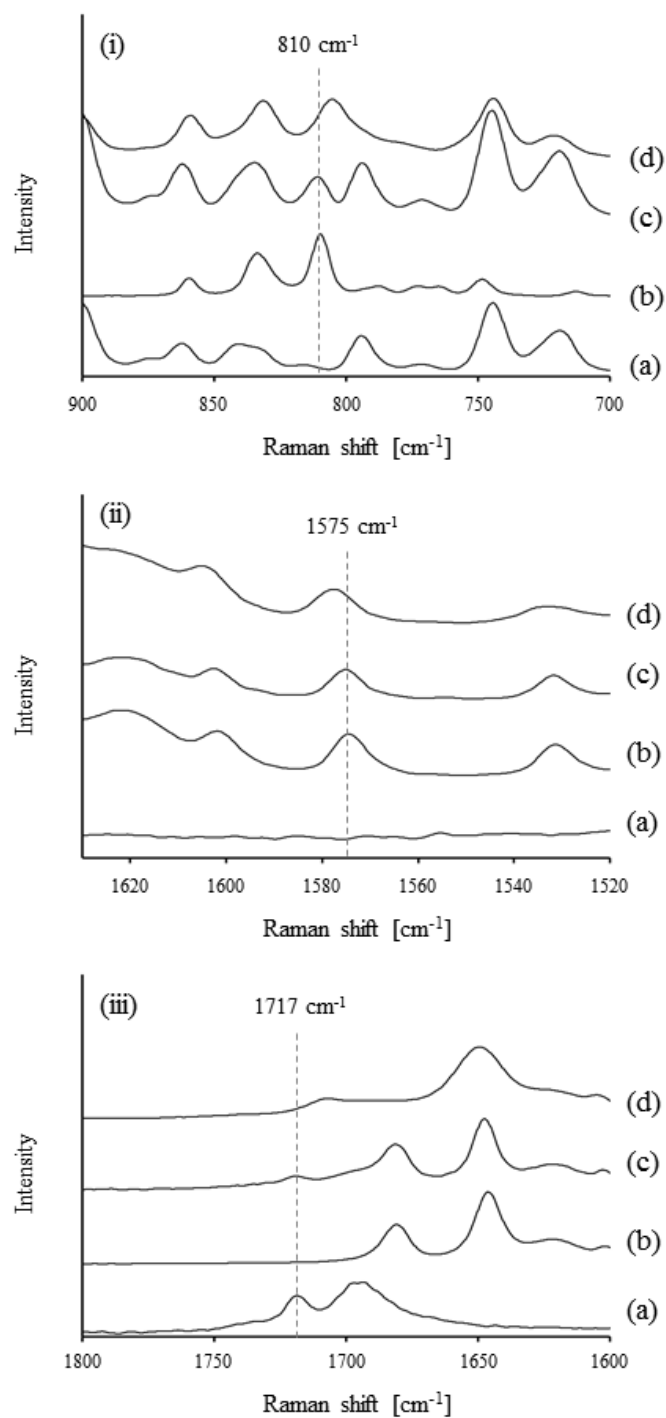
### 3.3.3 NIF-UDCA と NIF-PVP の物性比較

NIF-PVP は従来のポリマーを用いたアモルファス複合体であり，PVP のネットワーク中に NIF が分散した状態になっていると推察される．NIF-UDCA のラマンスペクトルは

NIF や UDCA およびそれら物理混合物と比較し、異なるピークを示した (Figure 27). これまでの NIF のラマンスペクトルに関する報告によると  $810\text{ cm}^{-1}$  と  $1575\text{ cm}^{-1}$  (Figure 27 (i), (ii)) のピークは NH 基と CH 環に起因するものである. また,  $1717\text{ cm}^{-1}$  (Figure 27 (iii)) のピークは UDCA のカルボキシル基に起因するピークと考えられる. つまり NIF-UDCA は NIF の NH と UDCA の COOH で相互作用を持つことを示しているが, NIF は弱塩基化合物 ( $\text{pK}_a = 2.17$ ), UDCA は弱酸化合物 ( $\text{pK}_a = 5.1$ ) であり,  $\Delta\text{pK}_a < 0$  (base – acid) であるためイオン結合ではない. また, 測定した NIF-UDCA の  $T_g$  は  $75^\circ\text{C}$ , Gordon-Taylor の式から計算される  $T_g$  は  $78.6^\circ\text{C}$  であり, 両者はほぼ一致した. もし, NIF-UDCA とおなじ単一相アモルファス複合体が化合物間でイオン結合のような強い結合をもつ場合は,  $T_g$  の理論値と測定値は一致しない<sup>105)</sup>. 以上の点から, NIF-UDCA は従来のポリマーを用いたアモルファス複合体と同様に分子状態で強い相互作用無しに混ざり合う事で複合体を形成していると考えられる. また, UDCA との複合体形成に必ずしもイオン結合が必要とならない事は多くの化合物適応を考えると利点である.

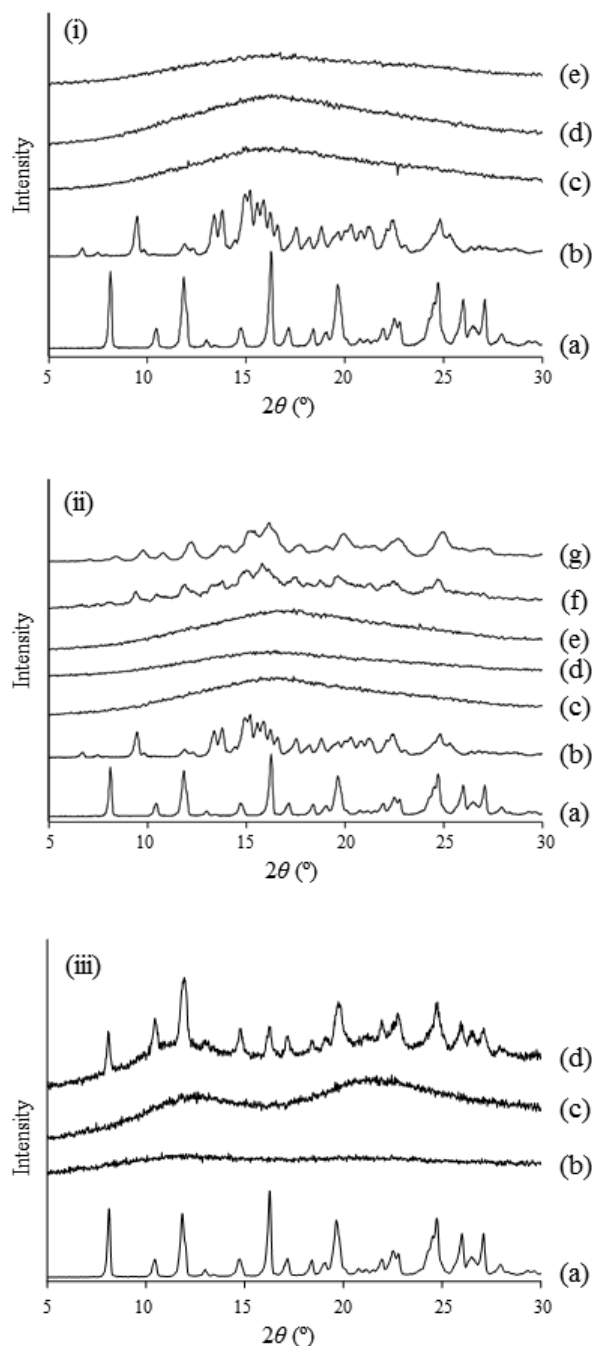
XRPD により, NIF-UDCA および NIF-PVP の物理安定性を評価した結果を Figure 28 に示す. NIF-UDCA は  $25^\circ\text{C}$ , 4 週間, すべての湿度条件にて結晶性由来の回折ピークを示さなかった. また,  $40^\circ\text{C}$  においても 0%RH の湿度条件であれば 4 週間結晶化しなかった. しかし,  $40^\circ\text{C}$  で高湿度条件では NIF, UDCA 両方の結晶性ピークが認められた. 一方で, NIF-PVP では  $25^\circ\text{C}$ , 100%RH の条件で 3 日後には NIF 由来の回折ピークを認めた. FE-SEM で湿度による粒子形態への影響をみると (Figure 29), NIF-UDCA では変化が認められなかったが, 100%RH で 1 日後に NIF-PVP では球形粒子から不定形粒子への変化が認められた. 加えて, NIF-PVP は NIF-UDCA よりも吸湿量が多いことが DVS 測定結果より観察され, 95%RH においては 40%もの重量変化が確認された (Figure 30). これらの結果は高湿度により NIF-PVP は粒子形状だけでなく分子状態も変化していることを示しており, アモルファス複合体の構成成分である PVP の吸湿性が反映されているものと推察される. NIF-PVP の  $T_g$  は NIF-UDCA よりも  $37^\circ\text{C}$  も高く, より物理的に安定なアモルファス状態と考えられるが, 物理安定性評価の結果は特に湿度に対し NIF-UDCA の方が安定であるという結果であった. 一般的に水の  $T_g$  が  $-138^\circ\text{C}$  と極めて低いことから<sup>106)</sup>, 吸湿することで大きく  $T_g$  が低下すると考えられており, NIF-PVP は高湿度条件で水を系内に含み, その結果  $T_g$  が低下してしまったため容易に結晶化してしまったものと推察される. 通常,  $T_g$  の値で物理安定性を考えることが多いが吸湿量を考慮した物理安定

性の予測は極めて困難であり，親水性ポリマーを用いたアモルファス複合体の弱点である．



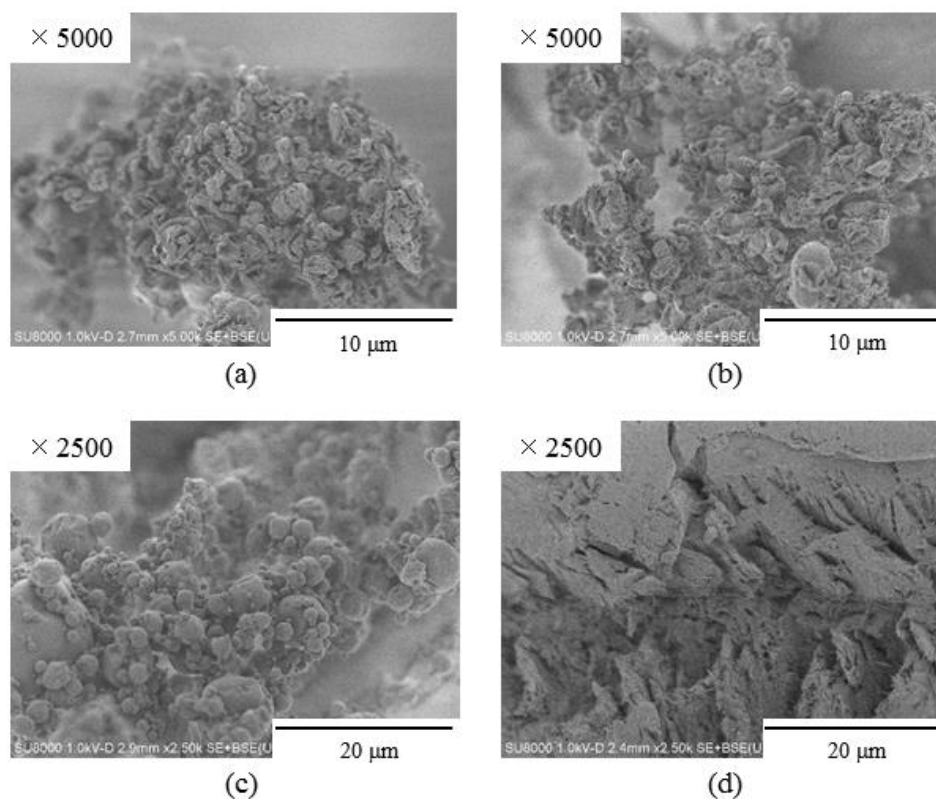
**Figure 27. Raman spectra**

(i) 900–700  $\text{cm}^{-1}$ , (ii) 1630–1520  $\text{cm}^{-1}$ , (iii) 1800–1600  $\text{cm}^{-1}$ . (a) UDCA crystal, (b) NIF crystal, (c) physical mixture of NIF and UDCA crystals, (d) NIF–UDCA



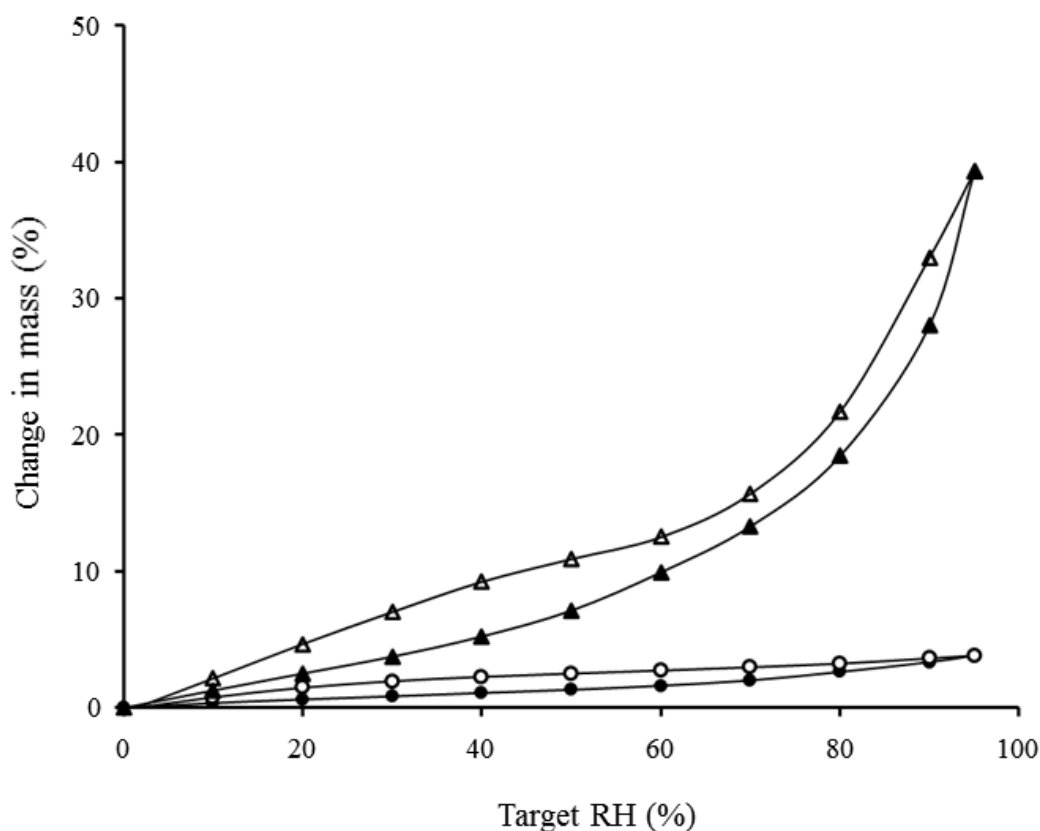
**Figure 28. XRPD patterns of NIF-UDCA or NIF-PVP after storage**

(i) NIF-UDCA, storage temperature = 25°C: (a) NIF crystal, (b) UDCA crystal, (c) 0% RH/4 weeks, (d) 75% RH/4 weeks, (e) 100% RH/4 weeks. (ii) NIF-UDCA, storage temperature = 40°C: (a) NIF crystal, (b) UDCA crystal, (c) 0% RH/1 week, (d) 0% RH/4 weeks, (e) 75% RH/1 week, (f) 75% RH/4 weeks, (g) 100% RH/4 weeks. (iii) NIF-UDCA, storage temperature = 25°C: (a) NIF crystal, (b) PVP, (c) 0% RH/4 weeks, (d) 100% RH/3 days.



**Figure 29. SEM images of NIF–UDCA and NIF–PVP**

(a) Initial sample of NIF–UDCA, (b) storage sample of NIF–UDCA in 100% RH for 1 day, (c) initial sample of NIF–PVP, (d) storage sample of NIF–PVP in 100% RH for 1 day.



**Figure 30. DVS profiles**

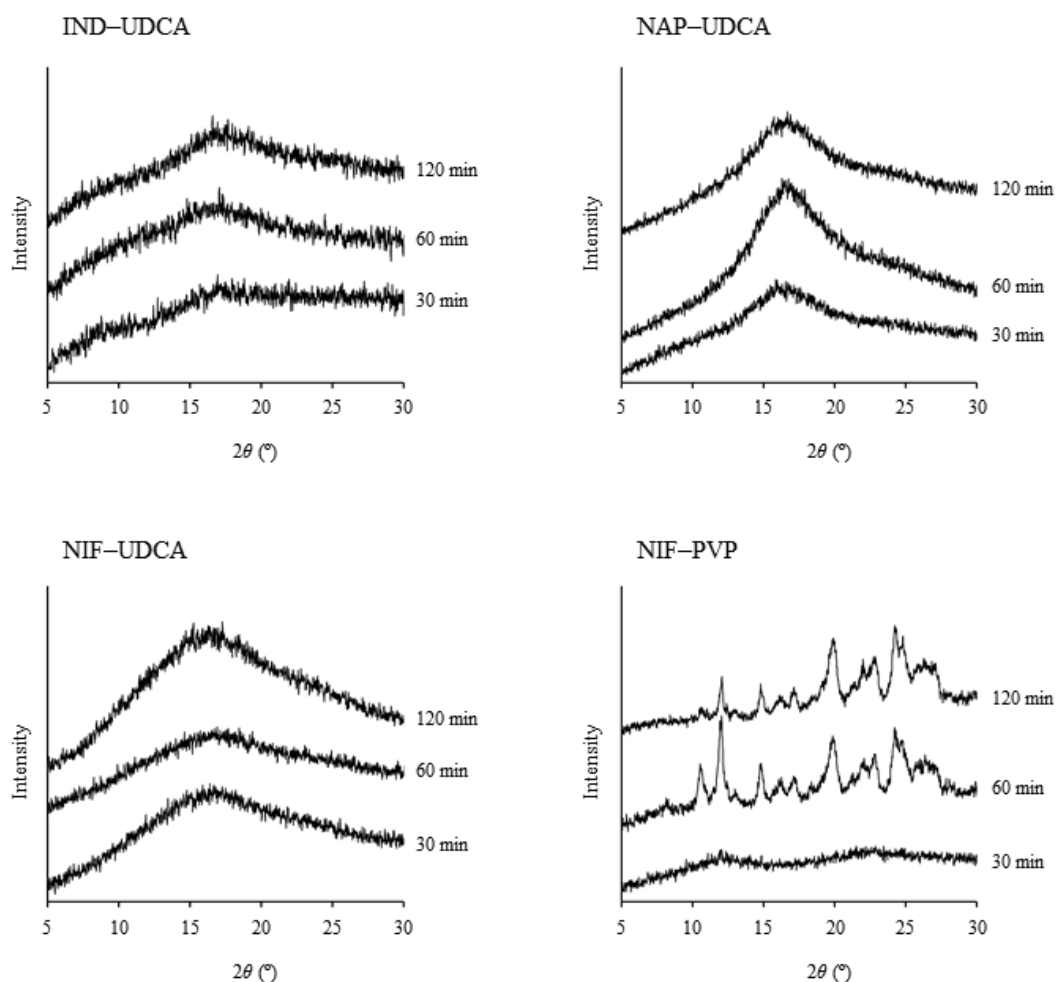
(●) NIF-UDCA sorption, (○) NIF-UDCA desorption, (▲) NIF-PVP sorption, (△) NIF-PVP desorption.

### 3.3.4 1%MC 水溶液中の固体状態評価

1%MC 水溶液は非臨床ステージにおける動物への投与媒体として広く使用される<sup>79, 80)</sup>。スプレードライで調製したそれぞれのアモルファス複合体を 1%MC 水溶液に懸濁させ、XRPD にて固体部分の測定を実施した (Figure 31)。PVP は NIF の結晶化抑制に対して、優れたポリマーであると知られているにも関わらず、1%MC 水溶液中では 60 分以内に NIF の結晶化が認められた。一方で UDCA をキャリアとした 3 つのアモルファス複合体では 120 分間結晶性由来の回折ピークは認められなかった。この事は懸濁液中固体がアモルファスである事を示しているが、固体状態の変化については言及できない。つまり構成成分のうちどちらか一方のみが溶出し、もう一方が固体 (アモルファス) という可能性

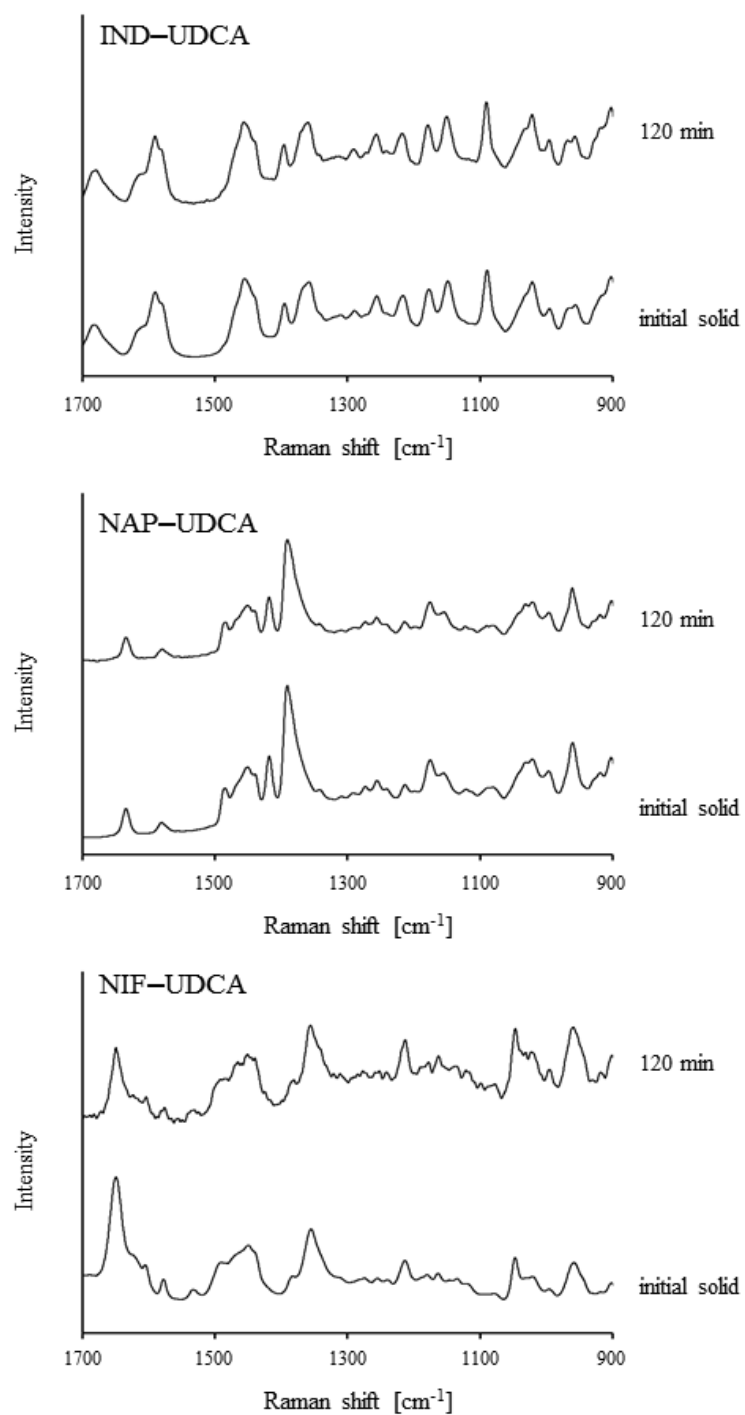
がある。このことを確認するため、IND-UDCA、NAP-UDCA および NIF-UDCA については 120 分間、懸濁させたサンプルのラマンスペクトルを取得した (Figure 32)。測定の結果、ラマンスペクトルからも変化は認められず、固体状態として変化がない事が確認された。

1%MC 水溶液における NIF 濃度を Figure 33 に示す。NIF-PVP は溶液濃度の低下が認められ、これは NIF の結晶化に由来するものと考えられる。一方で、NIF-UDCA は過飽和を維持し、NIF-PVP に対して約 2.2 倍の高い溶液濃度を示した。

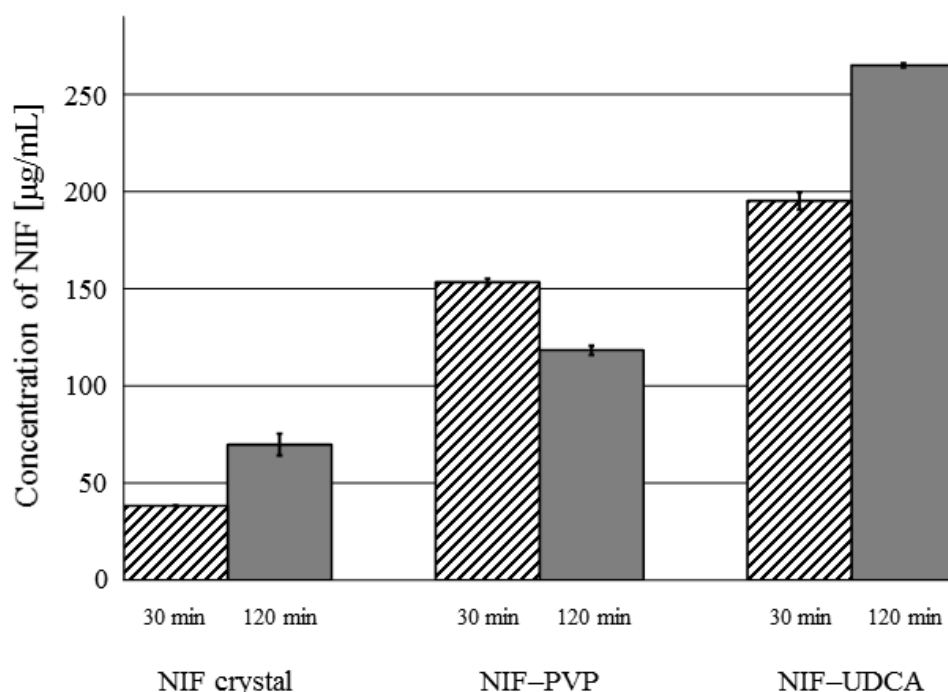


**Figure 31. XRPD patterns of solid composites after 30, 60, and 120 min in 1% MC suspension.**





**Figure 32. Raman spectra of initial sample and solid in 1% MC suspension**



**Figure 33. Concentration of NIF in 1% MC solution**

### 3.4 結論

本章では UDCA をキャリアとしたアモルファス複合体が高い物理安定性を示す事を述べた。solvent casting 法により原薬と UDCA の比率を最適化することができた。本手法は少量かつ簡便に実施できることから創薬の非臨床ステージで有用なスクリーニング手法である。また、スプレードライを用いて IND-UDCA, NAP-UDCA および NIF-UDCA の調製に成功し、これらのアモルファス複合体が高い物理安定性を示すことを確認した。特に従来のポリマーを用いたアモルファス複合体である NIF-PVP と比べ、高湿度下での安定性が高いことがわかった。水に対して物理的安定性が低い理由は親水性ポリマーの吸湿によるものであり、その性質が複合体にも反映されているからだと推察される。UDCA を用いた複合体は吸湿性を示さず、従来の親水性ポリマーをキャリアとした複合体に対する利点であると考えられる。

薬効試験や毒性試験では懸濁液で動物に投与されることが一般的である。NIF-PVP は

1%MC 水溶液中で 30 分間，結晶化を阻害することが可能であったが，60 分後には結晶が認められ溶液濃度が低下した．一方で，本研究で見出した UDCA を用いた複合体は 1%MC 水溶液中で 120 分間，原薬の結晶化を阻害し，高い溶液濃度を維持することが可能であった．120 分間の安定性が確保できれば，媒体の調製から投与まで実施することが可能である．UDCA を用いたアモルファス複合体は界面活性剤や有機溶媒を用いた製剤，また親水性ポリマーを用いたアモルファス複合体に代わる有用な非臨床製剤である．

## 4 両親媒性コポリマーの物性を利用した非晶質固体分散体の開発と評価

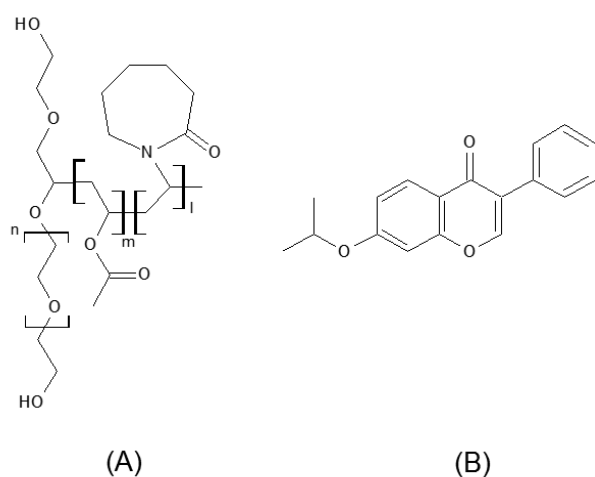
### 4.1 序論

ASD は難水溶性化合物の溶解性および溶解速度を改善するための製剤技術として広く用いられ、複数の臨床製剤が上市されている<sup>8)</sup>。活性化合物を分子状態で分散させ、物理的な安定性を得るためにポリマーをキャリアとして用いることが一般的であるが、ポリマーの物理化学的特性が ASD の物性として現れる<sup>107, 108)</sup>。例えば、前章で述べた吸湿性などもこの事例に合致する。ポリマーの物性を積極的に利用した製剤開発も実施されており、持続的放出型の製剤や pH 応答型の製剤、特異的な部位への放出を狙った製剤などの報告がある<sup>109-111)</sup>。つまり、キャリアとして用いるポリマーの物性を十分に理解することは目的の機能を有する製剤を開発するためには必要不可欠である。特に両親媒性コポリマーにおいては、水中でミセルを形成することで難水溶性化合物を溶解させるメカニズムを有しており<sup>112, 113)</sup>、大きく溶解度を改善できる期待がある反面、solubility-permeability interplay の観点からポリマーの使用量が多くなりすぎる事は膜透過の低下を生じさせるため、より特性を理解しておく必要がある。

Soluplus<sup>®</sup> (Figure 34 (A)) はポリビニルカプロラクタム、ポリビニルアセテートおよびポリエチレングリコールからなる共重合ポリマーであり、難水溶性化合物の溶解性改善に用いられている<sup>114, 115)</sup>。共重合ポリマーは親水性および疎水性官能基を有する事に起因し、両親媒性を示す事から水中でミセルを形成し、ミセル内に化合物を取り込むことが可能である<sup>116-118)</sup>。一般的に広く ASD のキャリアとして用いられているポリビニルピロリドンやヒドロキシメチルセルロースは水中で薬物と強い相互作用を示す事は無いため、両親媒性コポリマー特有の物性である。しかしながら、ミセル化に起因する Soluplus<sup>®</sup> の可溶化メカニズムはまだ解明されていない。

界面活性剤や両親媒性ポリマーのミセル形成に関する分析法については、表面張力測定、フーリエ変換赤外分光法、<sup>1</sup>H-NMR を用いた緩和測定、蛍光分光法、等温滴定熱量測定 (ITC) などが報告されている<sup>119-123)</sup>。その中で、ITC はミセル形成に伴う微細な熱挙動を測定することで、ミセル形成機構を理解することが可能である<sup>119, 124)</sup>。

本章では Soluplus<sup>®</sup>の水中におけるミセル形成機構および ASD のキャリアとして物性面からの研究結果について記述する．難水溶性化合物であるイプリフラボン（Figure 34 (B)）をモデル化合物として選択し，Soluplus<sup>®</sup>を用いた溶解性改善製剤について物性評価を行い，ポリマーの溶解性メカニズムの観点から考察した．



**Figure 34. Chemical structures**

(A) Soluplus<sup>®</sup>, (B) Ipriflavone

## 4.2 試料ならびに実験方法

### 4.2.1 試料

イプリフラボンは東和薬品より提供いただいた．Soluplus<sup>®</sup>は BASF Japan より入手した．各種溶媒やその他の物質はそれぞれ試薬グレードもしくは HPLC グレードのものを化学メーカーから入手した．

### 4.2.2 表面張力測定

Soluplus<sup>®</sup>水溶液の表面張力は動的表面張力計（SITA Science Line t60，英弘精機株式会社）により測定した．用いた装置は液中に発生させ，気泡にかかる圧力から表面張力を測定する．バブルライフタイムを 1000 ms とし，測定は 3 回実施した．

#### 4.2.3 濁度測定

Soluplus<sup>®</sup>水溶液の 0.01 から 100 mg/mL における濁度は紫外可視赤外分光光度計 (U-2900, 日立ハイテクサイエンス) を用いて測定した。波長は 500 nm とし, 3 回測定することで濁度を求めた。

#### 4.2.4 動的光散乱測定 (DLS)

Soluplus<sup>®</sup>を蒸留水に溶解させ, その粒子径分布を DLS (Nanotrac UPA UPA-UT151, MicrotracBEL) を用いて測定した。測定は 3 回実施した。

#### 4.2.5 等温滴定型カロリメトリー測定 (ITC)

Soluplus<sup>®</sup>水溶液のミセル化機構について確認するため, 熱力学的変化を ITC (MicroCal iTC200, Malvern Instrument) を用いて評価した。25°C に保った水に 50 mg/mL の Soluplus<sup>®</sup>水溶液を注入した際の熱量滴定を行った。サンプルセル (300  $\mu$ L) は水で満たされており, Soluplus<sup>®</sup>水溶液はシリンジからサンプルセルへと 750rpm で攪拌しながら, 1  $\mu$ L/120s の速度で滴下した。サンプルセル内で生じた熱力学的な変化を測定し, Soluplus<sup>®</sup>水溶液濃度に対応したエンタルピー変化を評価した<sup>119)</sup>。すべてのデータは付属ソフト (Origin iTC software, Malvern Instrument) により, 取得しデータの解析を行った。

#### 4.2.6 アモルファス固体分散体の調製

250 mg のイブプリフラボンと異なる量の Soluplus<sup>®</sup> (0, 500, 1250 および 2500 mg) をそれぞれ 100 mL の *tert*-ブチルアルコールに溶解させた。それら溶液を -40°C で凍結後, 凍結乾燥機 (FDU-830, 東京理科機器) を用いて 30 Pa, 24 h の条件でアモルファス固体分散体 (ASDs) を調製した。また, 調製した固体分散体と同じ比率の物理混合物 (PMs) を調製した。

#### 4.2.7 溶解度測定

イプリフラボン単体, PMs, ASDs におけるイプリフラボンの溶解度を測定した. 50 mg のイプリフラボンを含むそれぞれのサンプルに 25 mL の種々の Soluplus<sup>®</sup>水溶液 (PMs: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20, 100 mg/mL, ASDs: 4, 10, 20 mg/mL) を加え, 37°C で 100 strokes/min の条件でバスシェーカー (ML-10, TAITEC) を用いて攪拌した. 4 h および 24 h 後のサンプルを 15000×g にて遠心処理し, 上澄み液をメンブランフィルター (0.2 μm, PVDF) に通し, イプリフラボンの濃度を HPLC (SPD-10A, 島津製作所) にて測定した. 測定条件を以下に示す.

検出器: SPD-10A

ポンプ: LC-10AD

カラム: COSMOSIL (4.6 mmφ×150 mm, ナカライテスク)

カラム温度: 40°C

注入量: 10 μL

流速: 1 mL/min

移動相: acetonitrile–water (60 : 40)

検出波長: 254 nm

#### 4.2.8 溶出試験

イプリフラボン単体, PM (イプリフラボン : Soluplus<sup>®</sup>=1 : 10), ASD (イプリフラボン : Soluplus<sup>®</sup>=1 : 10) からの溶解性を溶出試験機 (NTR-8000AC, 富山産業) により評価した. 5.0 mg のイプリフラボンを含むそれぞれのサンプルを 37±0.5°C に保った蒸留水に加え, パドルにより 50rpm にて攪拌した. 各時間 (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) で 3 mL の試験液を抜き取り遠心処理後, 上澄み液をメンブランフィルター (0.2 μm, PVDF) に通し, 得られた溶液中のイソフラボン濃度を HPLC にて測定した. 測定条件は 4.2.7 を参照.

#### 4.2.9 XRPD 測定

XRPD データはデスクトップ型 X 線回折装置 (MiniFlex600, Rigaku) を用いて測定した. X 線源は Cu Kα, スキャン速度 4°/min, ステップサイズ 0.02°, 測定範囲 5–35° 2θ の

条件で測定を行った。

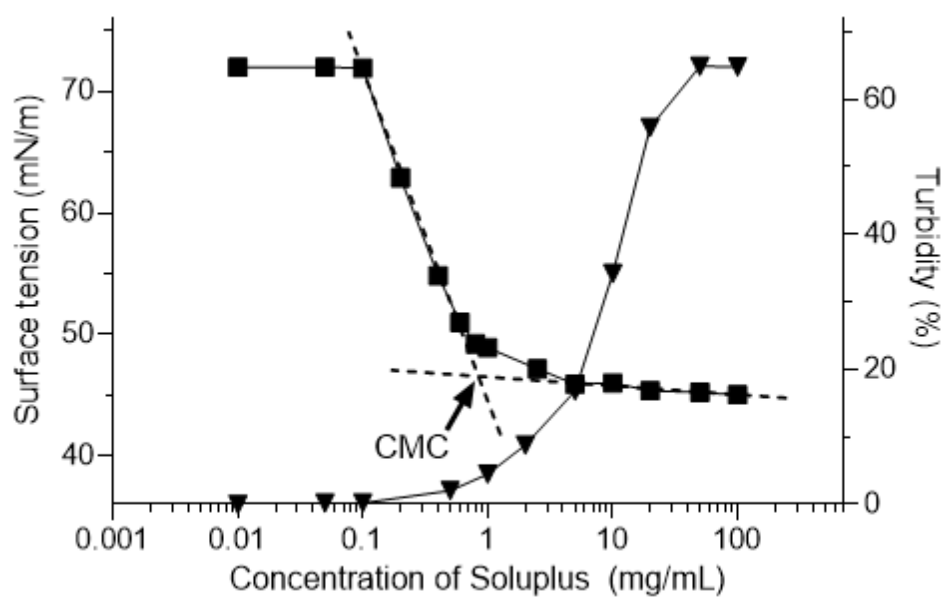
### 4.3 結果および考察

#### 4.3.1 Soluplus<sup>®</sup>の水中におけるミセル機構

Figure 35 に Soluplus<sup>®</sup>水溶液濃度と表面張力および濁度の関係を示す。表面張力は Soluplus<sup>®</sup>濃度に応じて徐々に減少し、おおよそ 10 mg/mL で一定となり、その値は 45.3 mN/m であった。これはミセル化による挙動と考えられ、Soluplus<sup>®</sup>の水溶液中における臨界ミセル濃度 (CMC) は 0.82 mg/mL と計算された。CMC 以上の濃度で水溶液の濁度は徐々に高くなった。これはミセル構造が形成された事を示しており、その粒子径は約 60 nm と DLS で確認された。また、このミセル構造は大気下で 24 h 変化が無いことを確認した。Soluplus<sup>®</sup>は親水性であるポリエチレングリコールを主鎖としており、また側鎖部分のビニルカプロラクタム/酢酸ビニルは親油性であるため、水溶液中でミセルを形成することができるのだと考えられる。この特性は難水溶性化合物の溶解性改善に利用することができる<sup>116, 118)</sup>。

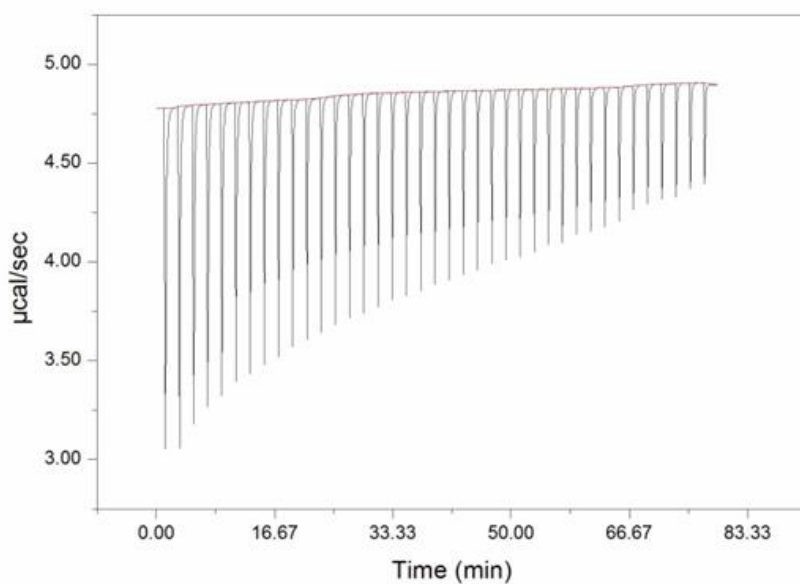
ミセル化機構に関するより詳細な知見を得るために、ITC を用いて Soluplus<sup>®</sup>水溶液の熱力学的な変化を評価した。ITC は界面活性剤や両親媒性ポリマーのミセル化に由来するエンタルピー変化を、プローブを必要とせずに 1 回の実験で定量することができ、ミセル形成に関する考察を行う上で有用なツールである<sup>119, 124, 125)</sup>。例えば、ラウリル硫酸ナトリウムや臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムといった従来の界面活性剤においては、ITC は sigmoidal curve を示す事が知られている<sup>119, 126)</sup>。しかしながら、Soluplus<sup>®</sup>は水溶液濃度に依存した熱反応によるエンタルピー変化を示したが、その変化は non-sigmoidal curve となった。(Figure 36)。この non-sigmoidal curve について分析することでミセル化プロセスの開始点 (ST) と終了点 (ET) をおおまかに知ることができ<sup>124, 127, 128)</sup>、Figure 36 (B)より ST は 0.82 mg/mL, ET は 3.56 mg/mL であると計算された。ST は表面張力から求めた CMC と一致した。



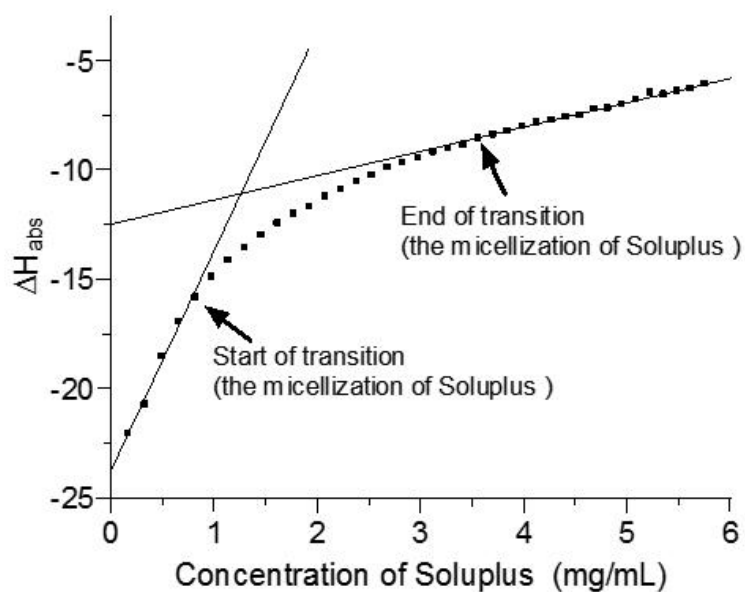


**Figure 35. Changes in the surface tension (■) and turbidity (▼) of soluplus<sup>®</sup> aqueous solution as a function of the soluplus<sup>®</sup> concentration in distilled water**

**(A)**



**(B)**



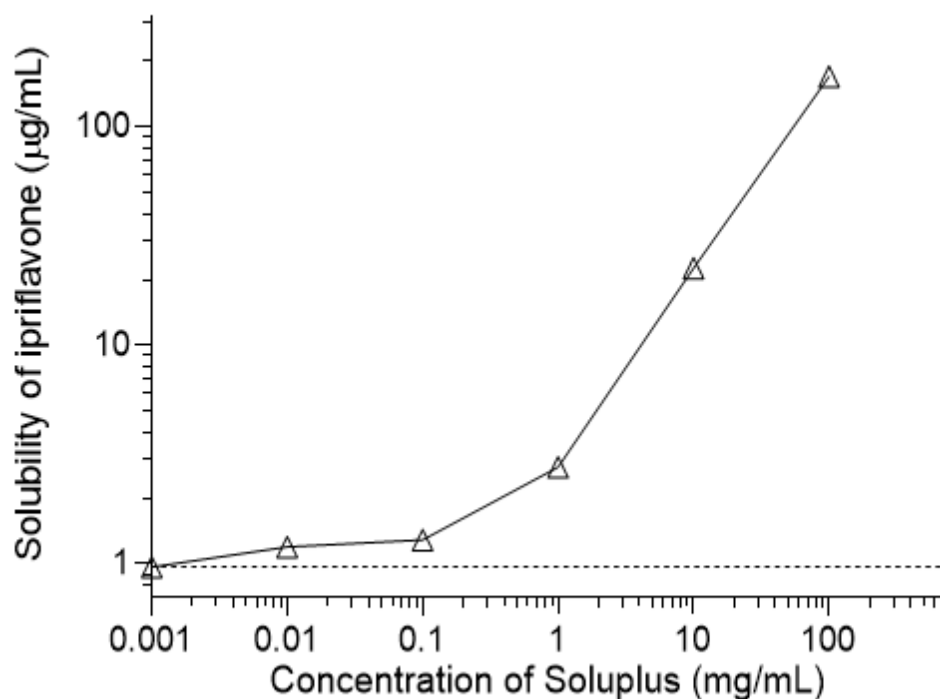
**Figure 36. Data obtained from the ITC analysis**

(A) Exothermic heat release on injection of Soluplus® solution into water.

(B) Integrated heat data from the ITC analysis. ST and ET, which represent the start of transition and end of micellization, respectively.

#### 4.3.2 Soluplus<sup>®</sup>による溶解度改善

Figure 37 にイプリフラボンと Soluplus<sup>®</sup>の物理混合物におけるイプリフラボンの溶解度を示す。ポリマー濃度依存的な薬物の溶解度の増加が確認され、特に CMC 以上の濃度で顕著な溶解度上昇が確認されたことから、ミセルに取り込まれたことにより溶解度が増加したものと考えられる。Soluplus<sup>®</sup>は酢酸ビニル基およびビニルカプロラクタム基をグラフト化することによって生成される親油性の官能基部分に疎水性化合物が相互作用可能な部位を複数有する<sup>129)</sup>。この事がイプリフラボンの高い溶解度改善につながったと考えられる。緒言で記述したように界面活性剤のような *thermodynamic solubility* を上昇させる添加剤は *solubility-permeability interplay* の観点からミセルへの薬物取り込みにより溶解度を上げる事ができる反面、膜透過を下げてしまう可能性がある。そのため、不必要に多量の添加剤を使用してはいけない。Figure 37 に示したように溶解度改善度合いと添加剤濃度の関係を把握し、目標とする溶解度から適切な使用量を考え、製剤設計をすることが重要である。



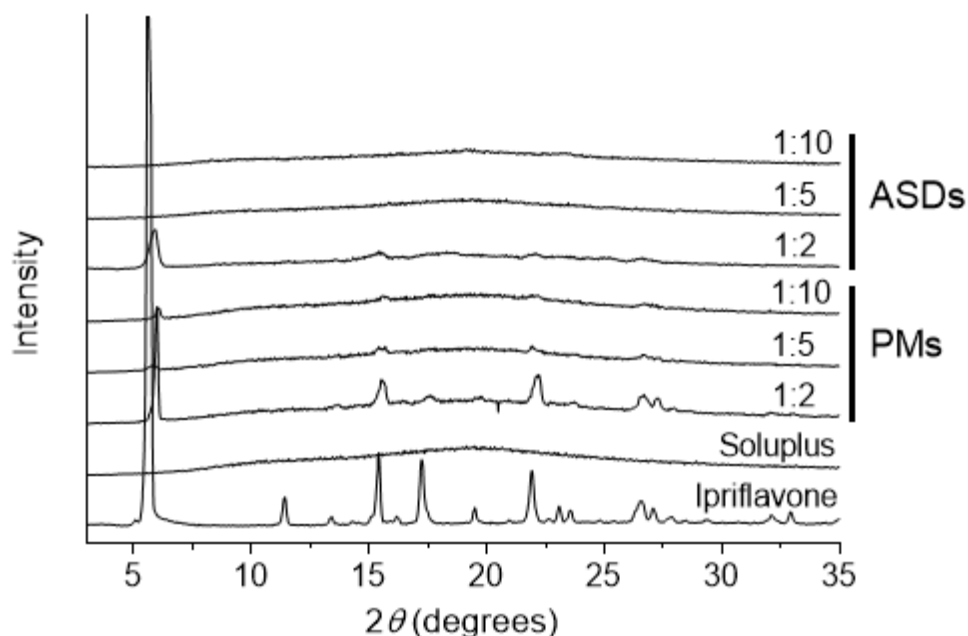
**Figure 37. Relationship between Soluplus® concentration and the solubility of ipriflavone when the simply blended powder was incubated for 24 h in water**

The dashed line represents the saturation solubility of ipriflavone in water (1.0 μg/mL)

#### 4.3.3 Soluplus®をキャリアとした固体分散体の調製

Soluplus®の  $T_g$  は  $69.4^{\circ}\text{C}^{130)}$ であり室温より高い  $T_g$  を示すことから、固体分散体のキャリアとして用いることで、物理混合物では無くより優れた製剤としての開発が期待できる。そこで Soluplus®をキャリアに用いたイプリフラボン ASD を凍結乾燥により調製し、物理化学的な評価を実施した。調製した ASDs および比較するために単体のイプリフラボン、Soluplus®および PMs の粉末 X 線回折パターンを Figure 38 に示す。PMs ではイプリフラボン : Soluplus®の比率が 1 : 10 のサンプルにおいても、イプリフラボン由来の回折ピークが確認されており、この含量であれば結晶の検出が可能であることを示している。一方で ASDs ではイプリフラボン : Soluplus®の比率が 1 : 2 のサンプルでは結晶性ピークが確認されたものの、1 : 5 および 1 : 10 のサンプルではハローパターンのみが観察されてお

り，ASD の調製が成功したことを示している．



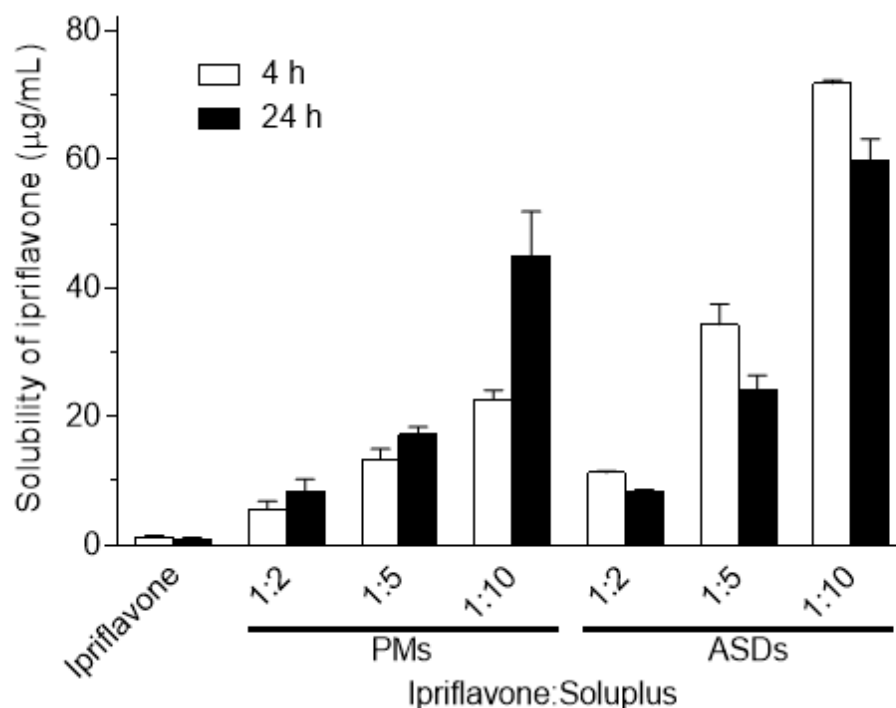
**Figure 38. XRPD patterns of ipriflavone samples**

#### 4.3.4 PMs および ASDs の溶解性評価

イプリフラボン単体，PMs および ASDs の溶解度を評価した結果を Figure 39 に示す．イプリフラボン単体では約 1.0  $\mu\text{g/mL}$  の溶解度であったが，PMs および ASDs はともに高い溶解性を示し，さらに薬物を取り込んだミセルは安定であり，イプリフラボンの溶解度が少なくとも 24 h は維持されることが確認された．特に ASD（イプリフラボン：Soluplus<sup>®</sup>=1：2）ではイプリフラボン単体に比べ，70 倍程度の高い溶解度を示した．PMs と ASDs を比較すると，特に ASDs は 4h で PMs より高い溶解性を示し，さらに 24h で溶解度の低下が認められることから，この増加分は ASD による過飽和の寄与分であると考えられる．過飽和により得た溶解性改善効果については solubility-permeability interplay の影響を受けないため，吸収改善につながる．

次に調製した製剤の溶出試験結果を Figure 40 に示す．イプリフラボン単体は 120 min で溶解度である 1.0  $\mu\text{g/mL}$  まで到達することができなかった．PM の溶出はイプリフラボ

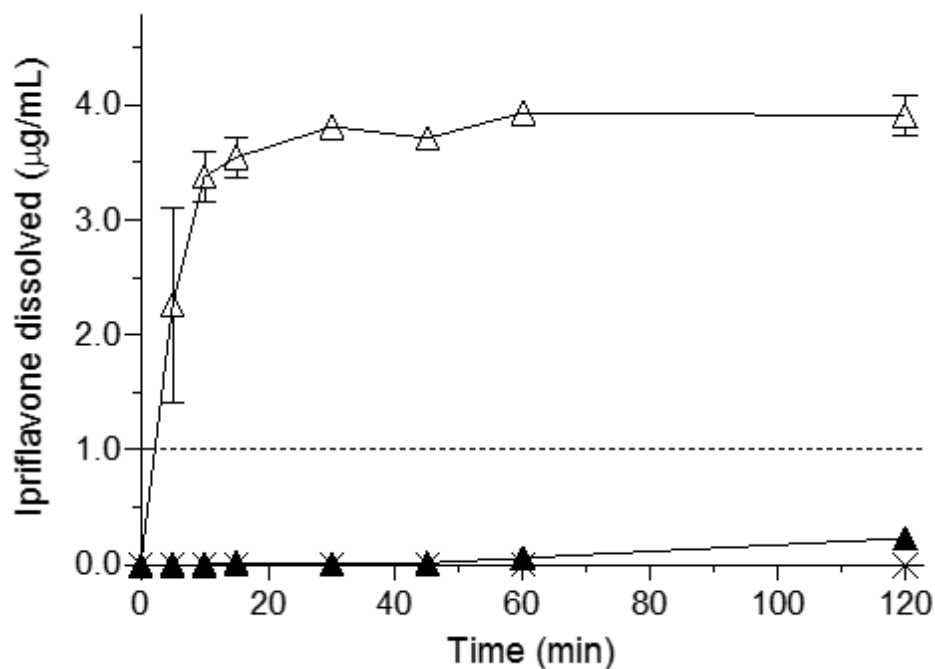
ン単体よりも若干の改善を認めたものの、 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$  まで到達することはできなかった。一方で ASD は高い溶出速度を示すとともに 120 min まで約  $4.0\text{ }\mu\text{g/mL}$  の高い濃度を示した。溶出試験には 55 mg の ASD が 900 mL の蒸留水に投入されている。そのため Soluplus<sup>®</sup>の濃度は  $0.056\text{ mg/mL}$  であり、CMC 以下である。本溶出試験におけるイプリフラボンの溶解度は約  $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$  であるため、ASD は約 4 倍の過飽和を示すことがわかった。これは試験初期において、ASD としたことで溶解速度が改善し、近傍に存在した Soluplus<sup>®</sup>ミセルに取り込まれることで立ち上がりの良い溶出プロファイルとなった。その後、攪拌され CMC 以下となることでミセルは崩壊するが、一度溶解したイプリフラボンはその後、結晶化することなく過飽和を維持したものと推察される。



**Figure 39. The solubility of ipriflavone samples**

untreated ipriflavone, PMs samples (ipriflavone : soluplus<sup>®</sup>=1 : 2, 1 : 5, 1 : 10), and ASD samples (ipriflavone : soluplus<sup>®</sup>=1 : 2, 1 : 5, 1 : 10)

Each bar represents the mean $\pm$ S.E. of three experiments.



**Figure 40. Dissolution profiles in distilled water at 37°C**

(×) untreated ipriflavone, (▲) PM (Ipriflavone : Soluplus®=1 : 10), (△) ASD (Ipriflavone : Soluplus®=1 : 10)

The dashed line represents the saturation solubility of ipriflavone in water (1.0 μg/mL). Each bar represents the mean±S.E. of three experiments.

#### 4.4 結論

本章では Soluplus® のミセル化機構について検討し、表面張力の測定から CMC 濃度が 0.82 mg/mL であること、DLS からミセル粒子の大きさは約 60 nm であることを明らかにした。また、ITC 測定ではミセル化によりイプリフラボンの可溶化が生じている事を確認した。つまり、Soluplus® による可溶化メカニズムがミセル構造に起因するものであるため、Solubility-permeability interplay により、膜透過速度の減少が起これば吸収の改善につながらない可能性が懸念される。しかしながら、各 Soluplus® 水溶液濃度におけるイプリフラボンの溶解度との関係を明らかにすることで、目的の溶解度を達成するための必要最小限の添加剤量を決定することが可能となった。これは通常、溶液での投与が求められる非臨床製剤について特に重要であり、投与する薬物量と媒体量から投与液の濃度を算出する

ことで、最適な非臨床液剤を設計可能である。

また、Soluplus<sup>®</sup>が室温以上の  $T_g$  を持つことから、臨床製剤を考慮し ASD の検討を行った。凍結乾燥によりポリマー含量が高い条件で ASD の調製に成功し、調製した ASD は PM に比べて高い溶解速度と過飽和を示した。また、溶出試験においては Soluplus<sup>®</sup>濃度が CMC 以下の条件において、4 倍程度の過飽和を示した。これはミセル崩壊後も過飽和を維持した結果だと考察している。通常、製剤は経口投与された後は胃から十二指腸、小腸、大腸の順に移行していき、その過程で胃液や腸液によって希釈されていく。Soluplus<sup>®</sup>を含む ASD は、初期には ASD による高い溶解速度と Soluplus<sup>®</sup>のミセル化によって高い溶解度を示したのち、希釈されミセルの崩壊とともに過飽和を形成することが可能と考えられる。すなわち吸収部位に到達する際の Soluplus<sup>®</sup>濃度を CMC 以下もしくは最小限の使用量とする製剤設計を行えば、Solubility-permeability interplay の影響を受けない理想的な臨床製剤の開発が可能となる。



## 5 総括

以上、4章にわたり、医薬品開発研究における分子複合体プラットフォームの設計および物性評価に関する研究の成果を述べた。

第1章では原薬に分子複合体である共結晶を適応する際に生じる課題を結晶構造設計の観点から克服した。フリー体溶媒和結晶の同形構造に着目することで、共結晶のコフォーマーを選択し目的の結晶構造を有する共結晶の結晶化に成功した。また、結晶構造解析から、コフォーマーが結晶構造中に存在するためには分子間の相互作用よりも分子の大きさと形が重要であることを明らかにした。従来の超分子シントンや熱力学的な計算からは見出すことができないコフォーマーであった。

第2章では前章と同様に原薬に新規な3成分分子複合体である塩共結晶を適応した研究成果であり、TFG-NaOAc および TFG-KOAc をスクリーニングにより見出した。結晶構造解析からその結合様式がこれまでに報告がない原薬分子と有機塩の複合体であることを明らかにした。加えて、TFG-KOAc には2つの結晶多形が存在し、それらは互変形の関係にあることを物性評価により考察した。

第3章ではUDCAをキャリアとした分子複合体を見出し、非臨床製剤として優れた物性を有していることを明らかにした。初めに solvent-casting 法によるスクリーニングから IND-UDCA, NAP-UDCA および NIF-UDCA の3つの新規アモルファス複合体を見出した。スプレードライヤを用いたスケールアップにも問題なく成功し、アモルファス複合体については大量調製を見込んだスクリーニング方法の選択がスムーズな医薬品開発に結びつく事を示した。さらにUDCAアモルファス複合体は1%MC水溶液中で2h以上の物理的安定性を示し、薬効試験や毒性試験時に生じる課題を克服できることを示した。

第4章は両新媒性ポリマーである Soluplus<sup>®</sup> のミセル化機構について物性研究を行った。CMCが0.82 mg/mLであることを明らかにし、難水溶性化合物がミセルに取り込まれることで溶解度が上がることをITC測定データから考察した。また、Soluplus<sup>®</sup> をキャリアとしたASDを調製し、溶解度測定と溶出試験の結果から、ミセル化とミセルの崩壊後の過飽和維持というプロセスを経ていると考察した。

医薬品開発の現場では難水溶性化合物の増加が著しく、創薬プロセスの各ステージで化合物の物性に起因した課題が頻繁に生じている。そのため、本研究では主に難水溶性化合

物の溶解性改善を目的とし、原薬・非臨床製剤・臨床製剤と様々な場面で適応することが可能な分子複合体に関する検討をおこなった。研究を進める上で意識したことは2つあり、1つめは企業研究者として実用性や効率性を考慮する事、2つめは物性研究者として原薬や添加剤の物性を複合体開発に生かす事やその溶解性改善メカニズムを理解する事である。前者について、第1章では共結晶スクリーニングを実施する事なく、共結晶を見出し、第3章ではスケールアップを意識したスクリーニング法を構築した。どちらも、創薬プロセスで重要な化合物量および検討期間の大幅な削減につながる。また後者について、第2章ではコフォーマーの物性が共結晶の物性に反映されうる事、第4章ではキャリアの物性を意識した製剤設計が重要な事を考察した。製剤設計においては溶解性改善のみに注目するあまり、本来の目的である吸収改善への意識が薄くなってしまうケースが見受けられる。Solubility-permeability interplay の考え方は製剤設計を行う上で非常に重要であり、原薬、添加剤およびそれらで構成される分子複合体の物性や溶解性改善メカニズムを考慮した研究を行う事が課題を克服する事に繋がる。創薬プロセスにおいて、化合物の分子構造の最適化は薬効、安全性、薬物動態、物性を考慮して数百から数千化合物も合成され評価される。そのすべてを満足することは非常に困難であるが、物性は化合物の構造を変えることなく改善することが可能である。本研究で構築した分子複合体プラットフォームを今後さらに改良を加えながら、研究の成果を医薬品の開発に生かし、革新的な医薬品開発に貢献したい。

また今後、分子複合体に関する検討は *in silico* を用いた研究がより活発になっていくと考えられる。第一原理計算、分子動力学、熱力学的な計算、AI など様々なアプローチが考えられるが、シミュレーションを行うためには正しい物理化学的特性の理解が必要不可欠である。物性研究者として計算科学と共同することで、物性や製剤に関する研究のさらなる発展に貢献していきたい。

## 6 謝辞

終わりに臨み，本研究の遂行に関しまして終始ご懇篤なるご指導，ご鞭撻を賜りました大阪薬科大学製剤設計学研究室 戸塚裕一教授に甚大なる謝意を表します．戸塚先生は常にデータに対して深く考察し，自分の研究に向かい合う姿勢を指導して下さいました．先生のご指導に恥じぬよう，今後も研究者として精一杯努力していく所存です．研究の方向性や論文の執筆に関して，ご指導を頂きました大阪薬科大学製剤設計学研究室 門田和紀准教授に深く感謝いたします．門田先生は最新の分子複合体研究や自身の研究成果に関する様々な議論を通して多くの有益なご助言をいただき，論文の執筆に関しましても多くのご指導をいただきました．また，数々の議論や実験にご協力いただきました大阪薬科大学製剤設計学研究室 内山博雅助教ならびに同研究室の皆様，誠にありがとうございました．

また，本研究遂行の機会と環境を与えて頂きました中外製薬株式会社前臨床研究部長 石谷雅樹博士，同じく前臨床研究部プレフォーミュレーショングループマネージャー 白木広治博士に心より感謝いたします．本研究を進めるにあたり，技術的な支援や結果に対する考察等，あらゆる面でご指導いただきました中外製薬株式会社前臨床研究部プリンシパル・サイエンティスト 高田則幸博士に多大なる感謝の意を表します．また，固体物性評価や結晶構造解析に関して，有意義な議論をさせていただきました中外製薬株式会社前臨床研究部プレフォーミュレーショングループ 植戸隆充博士，青木雅英氏，佐近彩博士に深く感謝いたします．

最後にまだまだ手がかかる子供 3 人の育児に追われる中，研究や論文作成に理解を示し，生活面や精神面などすべての面で支えてくれた妻 寛子に親愛と感謝の意を表します．

## 7 参考文献

1. C. A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *Journal of pharmacological and toxicological methods*, **44**, 235-249, (2000).
2. C. A. Lipinski, Poor aqueous solubility - An industry wide problem in drug discovery, *Am. Pharm. Rev.*, **5**, 82-85, (2002).
3. A. M. Thayer, Custom manufacturers take on DRUG SOLUBILITY ISSUES to help pharmaceutical firms move products through development, *Chem. Eng. News*, **88**, 13-18, (2010).
4. A. Dahan, A. Beig, D. Lindley and J. M. Miller, The solubility-permeability interplay and oral drug formulation design: Two heads are better than one, *Advanced drug delivery reviews*, **101**, 99-107, (2016).
5. D. Porat and A. Dahan, Active intestinal drug absorption and the solubility-permeability interplay, *Int J Pharm*, **537**, 84-93, (2018).
6. J. M. Miller, A. Beig, B. J. Krieg, R. A. Carr, T. B. Borchardt, G. E. Amidon, G. L. Amidon and A. Dahan, The solubility-permeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation, *Molecular pharmaceuticals*, **8**, 1848-1856, (2011).
7. A. Dahan, J. M. Miller, A. Hoffman, G. E. Amidon and G. L. Amidon, The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone, *Journal of pharmaceutical sciences*, **99**, 2739-2749, (2010).
8. Wyttenbach N. and Kuentz M., Glass-forming ability of compounds in marketed amorphous drug products, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V*, **112**, 204-208, (2017).
9. P. H. Stahl and Wermuth C.G., *Handbook of pharmaceutical salts: properites selection and use*, 2002.
10. S. L. Childs, G. P. Stahly and A. Park, The salt-cocrystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state, *Molecular pharmaceuticals*, **4**, 323-338, (2007).
11. Guidance for Industry: Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-crystals, <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm281764.pdf>.
12. Reflection paper on the use of cocrystals of active substances in medicinal products, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2015/07/WC500189927.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/07/WC500189927.pdf).
13. S. Aitipamula, R. Banerjee, A. K. Bansal, K. Biradha, M. L. Cheney, A. R. Choudhury, G. R.

- Desiraju, A. G. Dikundwar, R. Dubey, N. Duggirala, P. P. Ghogale, S. Ghosh, P. K. Goswami, N. R. Goud, R. R. K. R. Jetti, P. Karpinski, P. Kaushik, D. Kumar, V. Kumar, B. Moulton, A. Mukherjee, G. Mukherjee, A. S. Myerson, V. Puri, A. Ramanan, T. Rajamannar, C. M. Reddy, N. Rodriguez-Hornedo, R. D. Rogers, T. N. G. Row, P. Sanphui, N. Shan, G. Shete, A. Singh, C. Q. C. Sun, J. A. Swift, R. Thaimattam, T. S. Thakur, R. K. Thaper, S. P. Thomas, S. Tothadi, V. R. Vangala, N. Variankaval, P. Vishweshwar, D. R. Weyna and M. J. Zaworotko, Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name?, *Cryst. Growth Des.*, **12**, 2147-2152, (2012).
14. Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals, <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm516813.pdf>.
  15. 深水啓朗, 山下博之, 小野誠 and 池田幸弘, 医薬品の原薬形態である塩と共結晶のレギュレーションに関する現状と提言, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, **46**, 326-329, (2015).
  16. 深水啓朗, 谷田智嗣, 小出達夫, 我藤勝彦, 小野誠, 岩尾康範, 東頭二郎, 池田幸弘 and 米持悦生, 「共結晶を含む医薬品のレギュレーションに関する考察と一提言」ー共結晶体は原薬か製剤中間体かー, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, **48**, (2017).
  17. Bhugra C., Telang C., Schwabe R. and Zhong L., Reduced Crystallization Temperature Methodology for Polymer Selection in Amorphous Solid Dispersions: Stability Perspective, *Mol. Pharm.*, **13**, 3326-3333, (2016).
  18. Janssens S. and Van den Mooter G., Review: physical chemistry of solid dispersions, *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 1571-1586, (2009).
  19. S. L. Childs, N. Rodriguez-Hornedo, L. S. Reddy, A. Jayasankar, C. Maheshwari, L. McCausland, R. Shipplett and B. C. Stahly, Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine, *CrystEngComm*, **10**, 856-864, (2008).
  20. Takata N, Shiraki K, Takano R, Hayashi Y and Terada K, Cocrystal Screening of Stanolone and Mestanolone Using Slurry Crystallization, *Cryst. Growth Des.*, **8**, 3032-3037, (2008).
  21. T. Kojima, S. Tsutsumi, K. Yamamoto, Y. Ikeda and T. Moriwaki, High-throughput cocrystal slurry screening by use of in situ Raman microscopy and multi-well plate, *International journal of pharmaceuticals*, **399**, 52-59, (2010).
  22. K. Yamamoto, S. Tsutsumi and Y. Ikeda, Establishment of cocrystal cocktail grinding method for rational screening of pharmaceutical cocrystals, *International journal of pharmaceuticals*, **437**, 162-171, (2012).
  23. S. Karki, T. Friscic, W. Jones and W. D. Motherwell, Screening for pharmaceutical cocrystal hydrates via neat and liquid-assisted grinding, *Molecular pharmaceuticals*, **4**, 347-354, (2007).
  24. A. Fernandez Casares, W. M. Nap, G. Ten Figas, P. Huizenga, R. Groot and M. Hoffmann, An evaluation of salt screening methodologies, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, **67**, 812-

822, (2015).

25. P. C. Chiang, Y. Ran, K. J. Chou, Y. Cui, A. Sambrone, C. Chan and R. Hart, Evaluation of drug load and polymer by using a 96-well plate vacuum dry system for amorphous solid dispersion drug delivery, *AAPS PharmSciTech*, **13**, 713-722, (2012).
26. B. Van Eerdenbrugh and L. S. Taylor, Small scale screening to determine the ability of different polymers to inhibit drug crystallization upon rapid solvent evaporation, *Molecular pharmaceuticals*, **7**, 1328-1337, (2010).
27. N. Wyttenbach, C. Janas, M. Siam, M. E. Lauer, L. Jacob, E. Scheubel and S. Page, Miniaturized screening of polymers for amorphous drug stabilization (SPADS): rapid assessment of solid dispersion systems, *Eur J Pharm Biopharm*, **84**, 583-598, (2013).
28. A. Delori, P. T. Galek, E. Pidcock, M. Patoni and W. Jones, Knowledge-based hydrogen bond prediction and the synthesis of salts and cocrystals of the anti-malarial drug pyrimethamine with various drug and GRAS molecules *CrystEngComm*, 2916-2928, (2013).
29. A. Delori, P. T. Galek, E. Pidcock and W. Jones, Quantifying homo- and heteromolecular hydrogen bonds as a guide for adduct formation, *Chemistry*, **18**, 6835-6846, (2012).
30. D. R. Weyna, T. Shattock, P. Vishweshwar and M. J. Zaworotko, Synthesis and structural characterization of cocrystals and pharmaceutical cocrystals: Mechanochemistry vs slow evaporation from solution, *Cryst. Growth Des.*, **9**, 1106-1123, (2009).
31. C. B. Aakeröy and D. J. Salmon, Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility, *CrystEngComm*, **7**, 439-448, (2005).
32. S. L. Childs, L. J. Chyall, J. T. Dunlap, V. N. Smolenskaya, B. C. Stahly and G. P. Stahly, Crystal engineering approach to forming cocrystals of amine hydrochlorides with organic acids. Molecular complexes of fluoxetine hydrochloride with benzoic, succinic, and fumaric acids, *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 13335-13342, (2004).
33. N. Issa, P. G. Karamertzanis, G. W. A. Welch and S. L. Price, Can the Formation of Pharmaceutical Cocrystals Be Computationally Predicted? I. Comparison of Lattice Energies, *Crystal Growth & Design*, **9**, 442-453, (2009).
34. D. Musumeci, C. A. Hunter, R. Prohens, S. Scuderi and J. F. McCabe, Virtual cocrystal screening, *Chemical Science*, 883-890, (2011).
35. T. Grecu, C. A. Hunter, E. J. Gardiner and J. F. McCabe, Validation of a computational cocrystal prediction tool: Comparison of virtual and experimental cocrystal screening results *Cryst. Growth Des.*, **14**, 165-171, (2014).
36. Y. A. Abramov, C. Loschen and A. Klamt, Rational coformer or solvent selection for pharmaceutical cocrystallization or desolvation, *J. Pharm. Sci.*, **101**, 3687-3697, (2012).
37. F. T. P. Martins, N.; Doriguetto, A. C.; Ellena, J., Crystal Engineering of an Anti-HIV Drug Based on the Recognition of Assembling Molecular Frameworks, *Cryst. Growth Des.*, **9**, 5238-5292,

(2009).

38. K. Iwata, T. Kojima and Y. Ikeda, Solid Form Selection of Highly Solvating TAK-441 Exhibiting Solvate-Trapping Polymorphism, *Cryst. Growth Des.*, **14**, 3335-3342, (2014).
39. W. Xu, N. Gong, S. Yang, N. Zhang, L. He, G. Du and Y. Lu, Isostructurality among solvates of cabazitaxel: X-ray structures and new solvates preparation, *J. Pharm. Sci.*, **104**, 1256-1262, (2015).
40. S. A. Bourne, M. R. Caira, L. R. Nassimbeni and I. Shabalala, X-ray structural studies and physicochemical characterization of the 1-butanol, 1-pentanol, and 1,4-dioxane solvates of succinylsulfathiazole, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 887-892, (1994).
41. I. Sarcevic, I. Grante, S. Belyakov, T. Rekis, K. Berzins, A. Actins and L. Orola, Solvates of Dasatinib: Diversity and Isostructurality, *Journal of pharmaceutical sciences*, **105**, 1489-1495, (2016).
42. J. N. Moorthy, P. Natarajan, M. S. Krishna, H. Nagarajaiah and P. Venugopalan, Isomorphous three-component crystals (pseudopolymorphs of binary cocrystals) based on lattice inclusion of guests with a sterically-rigidified tetraarylpyrene host *CrystEngComm*, **17**, 5307-5314, (2015).
43. S. F. Alshahateet, M. M. Bhadbhade, R. Bishop and M. L. Scudder, Different solvents yield alternative crystal forms through aromatic, halogen bonding and hydrogen bonding competition *CrystEngComm*, **17**, 877-888, (2015).
44. O. Putra, D., E. Yonemochi and H. Uekusa, Isostructural Multicomponent Gliclazide Crystals with Improved Solubility, *Cryst. Growth Des.*, **16**, 6568-6573, (2016).
45. A. Bialonska and Z. Ciunik, Isomorphous brucinium 4-nitrobenzoate methanol solvate and brucinium 4-nitrobenzoate dihydrate, *Acta crystallographica. Section C, Crystal structure communications*, **63**, o120-122, (2007).
46. T. Gelbrich, T. L. Threlfall and M. B. Hursthouse, Eight isostructural 4,4'-disubstituted N-phenylbenzenesulfonamides, *Acta crystallographica. Section C, Crystal structure communications*, **68**, o421-426, (2012).
47. A. Berziņš and A. Actiņš, Why Do Chemically Similar Pharmaceutical Molecules Crystallize in Different Structures: A Case of Droperidol and Benperidol, *Cryst. Growth Des.*, **16**, 1643-1653, (2016).
48. H. Yoshino, H. Sato, K. Tachibana, T. Shiraishi, M. Nakamura, M. Ohta, N. Ishikura, M. Nagamuta, E. Onuma, T. Nakagawa, S. Arai, K. H. Ahn, K. Y. Jung and H. Kawata, Structure-activity relationships of bioisosteric replacement of the carboxylic acid in novel androgen receptor pure antagonists, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **18**, 3159-3168, (2010).
49. H. Yoshino, H. Sato, T. Shiraishi, K. Tachibana, T. Emura, A. Honma, N. Ishikura, T. Tsunenari, M. Watanabe, A. Nishimoto, R. Nakamura, T. Nakagawa, M. Ohta, N. Takata, K. Furumoto, K. Kimura and H. Kawata, Design and synthesis of an androgen receptor pure antagonist (CH5137291) for the treatment of castration-resistant prostate cancer, *Bioorganic & medicinal*

- chemistry*, **18**, 8150-8157, (2010).
50. N. Ishikura, H. Kawata, A. Nishimoto, R. Nakamura, T. Tsunenari, M. Watanabe, K. Tachibana, T. Shiraishi, H. Yoshino, A. Honma, T. Emura, M. Ohta, T. Nakagawa, T. Houjo, E. Corey, R. L. Vessella, Y. Aoki and H. Sato, CH5137291, an androgen receptor nuclear translocation-inhibiting compound, inhibits the growth of castration-resistant prostate cancer cells, *International journal of oncology*, **46**, 1560-1572, (2015).
  51. H. Kawata, S. Arai, T. Nakagawa, N. Ishikura, A. Nishimoto, H. Yoshino, T. Shiraishi, K. Tachibana, R. Nakamura and H. Sato, Biological properties of androgen receptor pure antagonist for treatment of castration-resistant prostate cancer: optimization from lead compound to CH5137291, *The Prostate*, **71**, 1344-1356, (2011).
  52. M. C. Burla, R. Caliendo, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Casciaro, L. De Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori and R. Spagna, SIR2004: An improved tool for crystal structure determination and refinement, *J. Appl. Crystallogr.*, **38**, 381-388, (2005).
  53. G. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A*, **64**, 112-122, (2008).
  54. R. Takano, K. Sugano, A. Higashida, Y. Hayashi, M. Machida, Y. Aso and S. Yamashita, Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test, *Pharmaceutical research*, **23**, 1144-1156, (2006).
  55. D. Good and N. Rodríguez-Hornedo, Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals, *Cryst. Growth Des.*, **9**, 2252-2264, (2009).
  56. H. Sahay, S. Kumar, S. N. Upadhyay and Y. D. Upadhyay, Solubility of benzoic acid in aqueous polymeric solutions, *J. Chem. Eng. Data*, **26**, 181-183, (1981).
  57. K. J. Paluch, L. Tajber, C. J. Elcoate, O. I. Corrigan, S. E. Lawrence and A. M. Healy, Solid-state characterization of novel active pharmaceutical ingredients: cocrystal of a salbutamol hemiadipate salt with adipic acid (2:1:1) and salbutamol hemisuccinate salt, *Journal of pharmaceutical sciences*, **100**, 3268-3283, (2011).
  58. Grifasi F., Chierotti M. R., Gaglioti K., Gobetto R., Maini L., Braga D., Dichiarante E. and Curzi M., Using Salt Cocrystals to Improve the Solubility of Niclosamide, *Cryst. Growth Des.*, **15**, 1939-1948, (2015).
  59. D. Braga, F. Grepioni, L. Maini, S. Prosperi, R. Gobetto and M. R. Chierotti, From unexpected reactions to a new family of ionic co-crystals: the case of barbituric acid with alkali bromides and caesium iodide, *Chemical communications*, **46**, 7715-7717, (2010).
  60. Kelley S. P., Narita A., Holbrey J. D., Green K. D., Reichert W. M. and Rogers R. D., Understanding the Effects of Ionicity in Salts, Solvates, Co-Crystals, Ionic Co-Crystals, and Ionic Liquids, Rather than Nomenclature, Is Critical to Understanding Their Behavior, *Cryst. Growth Des.*, **13**, 965-975, (2013).
  61. N. K. Duggirala, M. L. Perry, O. Almarsson and M. J. Zaworotko, Pharmaceutical cocrystals: along



the path to improved medicines, *Chemical communications*, **52**, 640-655, (2016).

62. A. M. Chen, M. E. Ellison, A. Peresykin, R. M. Wenslow, N. Variankaval, C. G. Savarin, T. K. Natishan, D. J. Mathre, P. G. Dormer, D. H. Euler, R. G. Ball, Z. Ye, Y. Wang and I. Santos, Development of a pharmaceutical cocrystal of a monophosphate salt with phosphoric acid, *Chemical communications*, DOI: 10.1039/b612353h, 419-421, (2007).
63. Velaga S. P., Basavoju S. and Boström D., Norfloxacin saccharinate–saccharin dihydrate cocrystal – A new pharmaceutical cocrystal with an organic counter ion, *J. Mol. Struct.*, **889**, 150-153, (2008).
64. Braga D., Grepioni F., Lampronti G. I., Maini L. and Turrina A., Ionic Co-crystals of Organic Molecules with Metal Halides: A New Prospect in the Solid Formulation of Active Pharmaceutical Ingredients, *Cryst. Growth Des.*, **11**, 5621-5627, (2011).
65. Y. Ohtake, T. Sato, T. Kobayashi, M. Nishimoto, N. Taka, K. Takano, K. Yamamoto, M. Ohmori, M. Yamaguchi, K. Takami, S. Y. Yeu, K. H. Ahn, H. Matsuoka, K. Morikawa, M. Suzuki, H. Hagita, K. Ozawa, K. Yamaguchi, M. Kato and S. Ikeda, Discovery of tofogliflozin, a novel C-arylglucoside with an O-spiroketal ring system, as a highly selective sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes, *Journal of medicinal chemistry*, **55**, 7828-7840, (2012).
66. Masatoshi Murakata, Takuma Ikeda, Nobuaki Kimura, Akira Kawase, Masahiro Nagase, Masahiro Kimura, Kenji Maeda, Akie Honma and Hitoshi Shimizu, The regioselective bromine–lithium exchange reaction of alkoxymethyldibromobenzene: A new strategy for the synthesis of tofogliflozin as a SGLT2 inhibitor for the treatment of diabetes, *Tetrahedron*, **73**, 655-660, (2017).
67. Y. Wang, X. Zhan, L. Luo, J. Chen, C. Xiang, C. Li and L. Li, Relationship between critical relative humidity and solubility of drugs, *Drug development and industrial pharmacy*, **37**, 547-551, (2011).
68. Burger A. and Ramberger R., On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. I, *Microchimica Acta*, **72**, 259-271, (1979).
69. R. Hilfiker, *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, WileyVCH, Weinheim, 2006.
70. S. R. Byrn, R. R. Pfeiffer and J. G. Stowell, *Solid-State Chemistry of Drugs; 2nd ed.*, SSCI, Inc., West Lafayette, IN, 1999.
71. Aitipamula S., Chowa P. S. and Tan R. B. H., Polymorphism in cocrystals: a review and assessment of its significance, *CrystEngComm*, **16**, 3451-3565, (2014).
72. Schultheiss N. and Newman A., Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties, *Cryst. Growth Des.*, **9**, 2950-2967, (2009).
73. D. Braga, G. Palladino, M. Polito, K. Rubini, F. Grepioni, M. R. Chierotti and R. Gobetto, Three polymorphic forms of the co-crystal 4,4'-bipyridine/pimelic acid and their structural, thermal, and spectroscopic characterization, *Chemistry*, **14**, 10149-10159, (2008).
74. Vangala V. R., Chow P. S., Schreyer M., Lau G. and Tan R. B. H., Thermal and in Situ X-ray Diffraction Analysis of a Dimorphic Co-Crystal, 1:1 Caffeine-Glutaric Acid, *Cryst. Growth Des.*,

- 16, 578-586, (2016).
75. Bolla G., Mittapalli S. and Nangia A., Celecoxib cocrystal polymorphs with cyclic amides: synthons of a sulfonamide drug with carboxamide coformers, *CrystEngComm*, **16**, 24-27, (2014).
  76. Aitipamula S., Chowa P. S. and Tan R. B. H., Conformational and enantiotropic polymorphism of a 1:1 cocrystal involving ethenzamide and ethylmalonic acid, *CrystEngComm*, **12**, 3691-3697, (2010).
  77. Bevill M. J., Vlahova P. I. and Smit J. P., Polymorphic Cocrystals of Nutraceutical Compound p-Coumaric Acid with Nicotinamide: Characterization, Relative Solid-State Stability, and Conversion to Alternate Stoichiometries, *Cryst. Growth Des.*, **14**, 1438-1448, (2014).
  78. Aitipamula S., Wong A. B. H., Chowa P. S. and Tan R. B. H., Polymorphism and phase transformations of a cocrystal of nicotinamide and pimelic acid *CrystEngComm*, **14**, 8193-8198, (2012).
  79. Palucki M., J. D. Higgin, Kwong E. and Templeton A. C., Strategies at the interface of drug discovery and development: early optimization of the solid state phase and preclinical toxicology formulation for potential drug candidates, *J. Med. Chem.*, **53**, 5897-5905, (2010).
  80. Shah S. M., Jain A. S., Kaushik R., Nagarsenker M. S. and Nerurkar M. J., Preclinical Formulations: Insight, Strategies, and Practical Considerations, *AAPS PharmSciTech*, **15**, (2014).
  81. Neervannan S., Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges, *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, **2**, 715-731, (2006).
  82. A. Beig, N. Fine-Shamir, D. Lindley, J. M. Miller and A. Dahan, Advantageous Solubility-Permeability Interplay When Using Amorphous Solid Dispersion (ASD) Formulation for the BCS Class IV P-gp Substrate Rifaximin: Simultaneous Increase of Both the Solubility and the Permeability, *The AAPS journal*, **19**, 806-813, (2017).
  83. Huang J., Wigent R. J. and Schwartz J. B., Drug-polymer interaction and its significance on the physical stability of nifedipine amorphous dispersion in microparticles of an ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 251-262, (2008).
  84. Ueda H., Muranushi N., Sakuma S., Ida Y., Endoh T., Kadota K. and Tozuka Y., A Strategy for Co-former Selection to Design Stable Co-amorphous Formations Based on Physicochemical Properties of Non-steroidal Inflammatory Drugs, *Pharmaceutical research*, **33**, 1018-1029, (2016).
  85. Chavan R. B., Thipparaboina R., Kumar D. and Shastri N. R., Co amorphous systems: A product development perspective, *International journal of pharmaceuticals*, **515**, 403-415, (2016).
  86. Dengale S. J., Grohgan H., Rades T. and Lobmann K., Recent advances in co-amorphous drug formulations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **100**, 116-125, (2016).
  87. Gao Y., Liao J., Qi X. and Zhang J., Coamorphous repaglinide-saccharin with enhanced dissolution, *International journal of pharmaceuticals*, **450**, 290-295, (2013).
  88. Yamamoto K., Kojima T., Karashima M. and Ikeda Y., Physicochemical Evaluation and

Developability Assessment of Co-amorphouses of Low Soluble Drugs and Comparison to the Co-crystals, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, (2016).

89. Zhu S., Gao H., Babu S. and Garad S., Co-Amorphous Formation of High-Dose Zwitterionic Compounds with Amino Acids To Improve Solubility and Enable Parenteral Delivery, *Mol. Pharm.*, **15**, 97-107, (2018).
90. Lobmann K., Laitinen R., Strachan C., Rades T. and Grohgan H., Amino acids as co-amorphous stabilizers for poorly water-soluble drugs--Part 2: molecular interactions, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, **85**, 882-888, (2013).
91. Lobmann K., Grohgan H., Laitinen R., Strachan C. and Rades T., Amino acids as co-amorphous stabilizers for poorly water soluble drugs--Part 1: preparation, stability and dissolution enhancement, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, **85**, 873-881, (2013).
92. Nakashima T., Anno T., Kanda H., Sato Y., Kuroi T., Fujii H., Nagadome S. and Sugihara G., Potentiometric study on critical micellization concentrations (CMC) of sodium salts of bile acids and their amino acid derivatives, *Colloid. Surf. B Biointerfaces*, **24**, 103-110, (2002).
93. Fukami T., Yamaguchi K., Tozuka Y., Moribe K., Oguchi T. and Yamamoto K., Novel channel structure of bile acid-guest inclusion complex formed between ursodeoxycholic acid and phenanthrene, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, **51**, 227-229, (2003).
94. Kadota K., Ehara M., Fujimori M., Sato H. and Tozuka T., Quantification of the Amorphous Content of Ursodeoxycholic acid by Pulsed NMR, *J. Pharm. Sci. Technol., Jpn.*, **76**, 117-122, (2016).
95. Ueno Y., Yonemochi E., Tozuka Y., Yamamura S., Oguchi T. and Yamamoto K., Characterization of amorphous ursodeoxycholic acid prepared by spray-drying, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 1213-1219, (1998).
96. Yonemochi E., Ueno Y., Ohmae T., Oguchi T., Nakajima S. and Yamamoto K., Evaluation of amorphous ursodeoxycholic acid by thermal methods, *Pharmaceutical research*, **14**, 798-803, (1997).
97. Nader A. M., Quinney S. K., Fadda H. M. and Foster D. R., Effect of Gastric Fluid Volume on the In Vitro Dissolution and In Vivo Absorption of BCS Class II Drugs: a Case Study with Nifedipine, *AAPS J.*, **18**, 981-988, (2016).
98. Wu C. Y. and Benet L. Z., Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, *Pharmaceutical research*, **22**, 11-23, (2005).
99. Kistenmacher J. T. and Marsh E. R., Crystal and molecular structure of an antiinflammatory agent, indomethacin, 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1340-1345, (1972).

100. Ravikumar K., Rajan S. S., Pattabhi V. and Gabe J. E., Structure of naproxen, C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, *Acta Crystallogr., Sect. C*, **41**, 280-282, (1985).
101. Trigg A. M., Shefter E. and Trigg D. J., Crystal structures of calcium channel antagonists: 2,6-dimethyl-3,5-dicarbomethoxy-4-[2-nitro-, 3-cyano-, 4-(dimethylamino)-, and 2,3,4,5,6-pentafluorophenyl]-1,4-dihydropyridine, *J. Med. Chem.*, **23**, 1442-1445, (1980).
102. Gordon M. and Taylor J. S., Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers, *J. Appl. Chem.*, **2**, 493-501, (1952).
103. Higuchi I., Kamitori S., Hirotsu K. and Takeda H., ウルソデオキシ酸の構造, *Yakugaku Zasshi*, **105**, 1115-1121, (1985).
104. Nakano K., Sada K., Kurozumi Y. and Miyata M., Importance of packing coefficients of host cavities in the isomerization of open host frameworks: guest-size-dependent isomerization in cholic acid inclusion crystals with monosubstituted benzenes, *Chemistry*, **7**, 209-220, (2001).
105. Jensen K. T., Larsen F. H., Lobmann K., Rades T. and Grohgan H., Influence of variation in molar ratio on co-amorphous drug-amino acid systems, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, **107**, 32-39, (2016).
106. Hancock B. C. and G. Zografi, The relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids, *Pharm Res*, **11**, 471-477, (1994).
107. H. Ueda, S. Wakabayashi, J. Kikuchi, Y. Ida, K. Kadota and Y. Tozuka, Anomalous role change of tertiary amino and ester groups as hydrogen acceptors in eudragit E based solid dispersion depending on the concentration of naproxen, *Molecular pharmaceuticals*, **12**, 1050-1061, (2015).
108. H. Ueda, S. Aikawa, Y. Kashima, J. Kikuchi, Y. Ida, T. Tanino, K. Kadota and Y. Tozuka, Anti-plasticizing effect of amorphous indomethacin induced by specific intermolecular interactions with PVA copolymer, *Journal of pharmaceutical sciences*, **103**, 2829-2838, (2014).
109. J. Hecq, F. Siepmann, J. Siepmann, K. Amighi and J. Goole, Development and evaluation of chitosan and chitosan derivative nanoparticles containing insulin for oral administration, *Drug development and industrial pharmacy*, **41**, 2037-2044, (2015).
110. D. E. Zecevic, R. Meier, R. Daniels and K. G. Wagner, Site specific solubility improvement using solid dispersions of HPMC-AS/HPC SSL--mixtures, *Eur J Pharm Biopharm*, **87**, 264-270, (2014).
111. J. Li, I. W. Lee, G. H. Shin, X. Chen and H. J. Park, Curcumin-Eudragit(R) E PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin, *Eur J Pharm Biopharm*, **94**, 322-332, (2015).
112. S. J. Tabatabaei Rezaei, H. S. Abandansari, M. R. Nabid and H. Niknejad, pH-responsive unimolecular micelles self-assembled from amphiphilic hyperbranched block copolymer for efficient intracellular release of poorly water-soluble anticancer drugs, *Journal of colloid and interface science*, **425**, 27-35, (2014).

113. R. Rashid, D. W. Kim, A. M. Yousaf, O. Mustapha, D. Fakhar Ud, J. H. Park, C. S. Yong, Y. K. Oh, Y. S. Youn, J. O. Kim and H. G. Choi, Comparative study on solid self-nanoemulsifying drug delivery and solid dispersion system for enhanced solubility and bioavailability of ezetimibe, *International journal of nanomedicine*, **10**, 6147-6159, (2015).
114. S. D. Han, S. W. Jung, S. W. Jang, H. J. Jung, M. Son, B. M. Kim and M. J. Kang, Preparation of solid dispersion of dronedarone hydrochloride with Soluplus(R) by hot melt extrusion technique for enhanced drug release, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **63**, 295-299, (2015).
115. E. S. Ha, I. H. Baek, W. Cho, S. J. Hwang and M. S. Kim, Preparation and evaluation of solid dispersion of atorvastatin calcium with Soluplus(R) by spray drying technique, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **62**, 545-551, (2014).
116. H. Yu, D. Xia, Q. Zhu, C. Zhu, D. Chen and Y. Gan, Supersaturated polymeric micelles for oral cyclosporine A delivery, *Eur J Pharm Biopharm*, **85**, 1325-1336, (2013).
117. Z. K. Nagy, A. Balogh, B. Vajna, A. Farkas, G. Patyi, A. Kramarics and G. Marosi, Comparison of electrospun and extruded Soluplus(R)-based solid dosage forms of improved dissolution, *Journal of pharmaceutical sciences*, **101**, 322-332, (2012).
118. L. Dian, E. Yu, X. Chen, X. Wen, Z. Zhang, L. Qin, Q. Wang, G. Li and C. Wu, Enhancing oral bioavailability of quercetin using novel soluplus polymeric micelles, *Nanoscale research letters*, **9**, 2406, (2014).
119. K. Bouchemal, F. Agnely, A. Koffi and G. Ponchel, A concise analysis of the effect of temperature and propanediol-1, 2 on Pluronic F127 micellization using isothermal titration microcalorimetry, *Journal of colloid and interface science*, **338**, 169-176, (2009).
120. J. Zhang, Y. Tozuka, H. Uchiyama, K. Higashi, K. Moribe, H. Takeuchi and K. Yamamoto, NMR investigation of a novel excipient, alpha-glucosylhesperidin, as a suitable solubilizing agent for poorly water-soluble drugs, *Journal of pharmaceutical sciences*, **100**, 4421-4431, (2011).
121. S. Zhang, N. Li, L. Zheng, X. Li, Y. Gao and L. Yu, Aggregation behavior of pluronic triblock copolymer in 1-butyl-3-methylimidazolium type ionic liquids, *The journal of physical chemistry. B*, **112**, 10228-10233, (2008).
122. Y. L. Su, J. Wang and H. Z. Liu, Melt, hydration, and micellization of the PEO-PPO-PEO block copolymer studied by FTIR spectroscopy, *Journal of colloid and interface science*, **251**, 417-423, (2002).
123. J. H. Ma, C. Guo, Y. L. Tang and H. Z. Liu, <sup>1</sup>H NMR spectroscopic investigations on the micellization and gelation of PEO-PPO-PEO block copolymers in aqueous solutions, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, **23**, 9596-9605, (2007).
124. Bouchemal K., Agnely F. and P. G. Koffi A., What can isothermal titration microcalorimetry experiments tell us about the self - organization of surfactants into micelles?, *J. Colloid. Interface Sci.*, **23**, 335-342, (2010).

125. Ferenc L. and Istvan S., *Acta Pharm. Hung.*, **65**, (1995).
126. K. Beyer, D. Leine and A. Blume, The demicellization of alkyltrimethylammonium bromides in 0.1 M sodium chloride solution studied by isothermal titration calorimetry, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **49**, 31-39, (2006).
127. J. E. Klijn, J. Kevelam and J. B. Engberts, Aggregation Behavior of Mono-endcapped Hydrophobically Modified Poly(sodium acrylate)s in Aqueous Solution, *Journal of colloid and interface science*, **226**, 76-82, (2000).
128. C. Roques, K. Bouchemal, G. Ponchel, Y. Fromes and E. Fattal, Parameters affecting organization and transfection efficiency of amphiphilic copolymers/DNA carriers, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **138**, 71-77, (2009).
129. Z. Guo, M. Lu, Y. Li, H. Pang, L. Lin, X. Liu and C. Wu, The utilization of drug-polymer interactions for improving the chemical stability of hot-melt extruded solid dispersions, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, **66**, 285-296, (2014).
130. P. Barmapalexis, A. Karagianni and K. Kachrimanis, Molecular simulations for amorphous drug formulation: Polymeric matrix properties relevant to hot-melt extrusion, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, **119**, 259-267, (2018).

## 8 論文目録

Satoshi Tanida, Tsuyoshi Kurokawa, Hideyuki Sato, Kazunori Kadota, Yuichi Tozuka  
Evaluation of the Micellization Mechanism of an Amphipathic Graft Copolymer with Enhanced Solubility of Ipriflavone  
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 64, 1, 68-72(2016)

Satoshi Tanida, Noriyuki Takata, Ryusuke Takano, Aya Sakon, Takamitsu Ueto, Koji Shiraki, Kazunori Kadota, Yuichi Tozuka, Masaki Ishigai  
Cocrystal structure design for CH5134731 based on isomorphism  
CrystEngComm, 20, 3, 362-369(2018)

Noriyuki Takata, Satoshi Tanida, Shinichi Nakae, Koji Shiraki, Yuichi Tozuka, Masaki Ishigaia  
Tofogliflozin Salt Cocrystals with Sodium Acetate and Potassium Acetate  
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 66, 11, 1035-1040(2018)

Satoshi Tanida, Aika Yoshimoto, Miyabi Yoshida, Hiromasa Uchiyama, Kazunori Kadota, Yuichi Tozuka  
Preparation of Amorphous Composite Particles of Drugs with Ursodeoxycholic Acid as Preclinical Formulations  
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, アクセプト済み (2018/09/25)