

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

学位論文要旨

2013 年 11 月 29 日
東邦大学大学院 薬学研究科
山下博之

タイトル：共結晶の相図に基づく熱力学研究とスクリーニングへの応用

【序論】

共結晶は2つ、もしくは、それ以上のコンポーネントが一定の割合で結晶化したものと一般には定義される。共結晶は、塩と同様に、溶解性や安定性といった物性を改善することができるため、近年、医薬品業界において注目されている。共結晶の調製手法としては、溶液晶析法、スラリーコンバージョン法や粉碎法などいくつか報告されている。これらの中でも、熱的手法は、溶媒を使用しないクリーンな技術であり、かつ晶析溶媒の溶解性に依存しない効率的な手法として認識されている。一方、熱的手法による共結晶化の詳細はこれまで明らかとなっていない。

一般的に、複合体（共結晶）を形成する場合の二成分系の物理的混合物の相図を Fig. 1 に示した。2つのタイプが知られており、一つは、Congruent タイプ、もう一つは、Incongruent タイプと呼ばれている。相図に基づく平衡論的な挙動から次のように考えられる。Congruent タイプにおいては (Fig. 1A), 1:1 の物理的混合物を加温したとき、成分 A と成分 B が準安定共融温度 (T_{m-E}) において融解し、その後すぐに複合体を形成する。この複合体は、複合体の融点 (T_c) で融解する。DSC を使った時には、準安定共融温度 T_{m-E} における準安定共融解に伴う一つの吸熱ピークに続いて、複合体化に伴う一つの発熱ピークが確認され、その後、複合体の融解に伴う別の吸熱ピークが温度 T_c において確認されると考えられる。Incongruent タイプ (Fig. 1B) においては、同じく 1:1 の物理的混合物を加温したとき、成分 A と成分 B が準安定共融温度 (T_{m-E}) において融解し、複合体を形成する。ここまでは、Congruent タイプと同じである。次に、包晶温度 (T_p) において複合体が融解すると同時に、成分 B の結晶化が起こると考えられる。この点が Congruent タイプと大きく異なる。その後、温度徐々に成分 B の結晶は融解していく。これを DSC で見た時には、準安定共融温度において準安定共融解に伴う一つの吸熱ピークと共結晶化に伴う一つの発熱ピークが確認されるだけでなく、温度 T_p において、共結晶の融解に伴う吸熱ピークおよび成分 B の結晶化に伴う発熱ピークが確認されると考えられる。その後、成分 B の結晶が徐々に融解することに伴うブロードな吸熱ピークが確認される。

参考のために、共結晶を形成しない 2 成分の物理的混合物の相図を Fig. 1C に示した。この物理的混合物の平衡論的熱挙動は、次の通りである。1:1 の物理的混合物を加温した場合、成分 A のすべてと成分 B の一部が共融温度 (T_E) において融解し、残った成分 B の結晶は加温とともに徐々に融解すると考えられる。DSC を使った場合には、共融温度 T_E で共融解に伴う一つの吸熱ピークがみられ、その後、成分 B が徐々に融解していくことに伴うブロードな吸熱ピークが確認されるはずである。

複合体を形成する場合としない場合を比較したとき、大きく異なる点は、発熱ピークが生じる現象の有無である。複合体を形成しうる二成分を加温した場合には、必ず一つもしくは二つの発熱ピークが理論的には検出される。平衡論的には、上記のとおりであるが、実際は必ずしも平衡論的に挙動するとは限らない。本研究においては、複合体形成の熱力学的現象を共結晶に応用し、DSC および X 線 DSC といった分析装置を用いて、平衡論のみならず、速度論的な観点からも考察を試みた。

また、医薬品業界において、API と塩共結晶を形成する Coformer を効率よく見出だしたい、という潜在的ニーズがある。本研究で明らかとなった熱的挙動と共結晶形成の関係に基づき、二成分の相図に基づく熱的手法による新たな Coformer スクリーニング系の構築を試みた。さらに本スクリーニング手法と既存のスクリーニング手法の結果との比較考察を実施した。

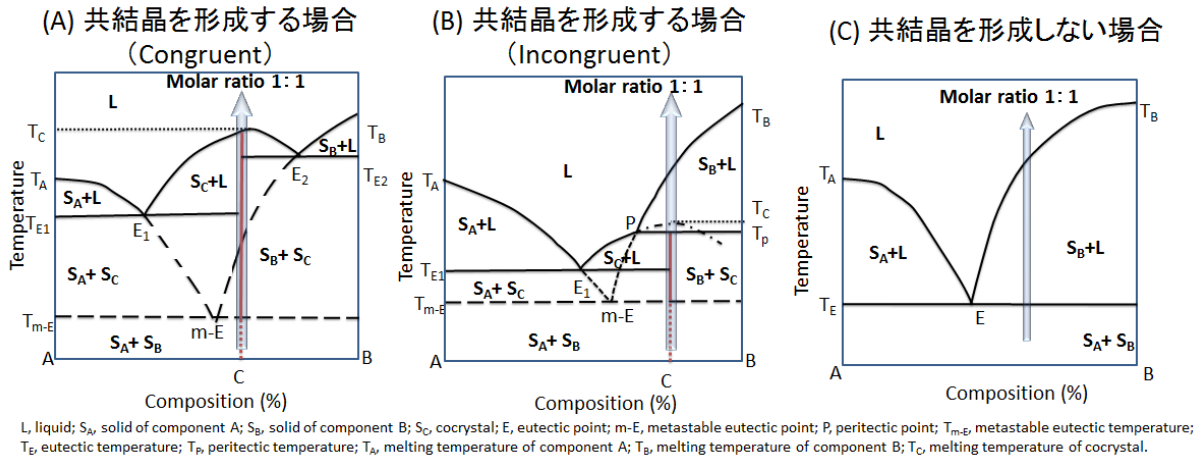


Fig. 1. 二成分系で認められる相図のタイプ

第一部：二成分系の相図に基づく物理的混合物の熱的挙動と共結晶形成の整理

【目的】

二成分系の相図に基づく平衡論的熱的挙動が DSC によって観察できるかどうかの確認を行った。

【方法】

医薬品成分 (Active Pharmaceutical Ingredient, API) と有機化合物 (Coformer) の 1:1 の混合物をメノウ乳鉢で粉砕し、均一な物理的混合物を調製した。示差走査熱量測定装置 (Differential Scanning Calorimetry, DSC) を使って、昇温速度 2, 5, 10, そして 30°C/min の 4 条件で 25°C から 300°C まで測定を実施した。必要に応じて、X 線 DSC 測定や偏光顕微鏡観察を実施した。

【結果】

本研究では、20 種の物理的混合物を調製した。そのうち、共結晶の報告があるのは 17 種であったが、これらを物理的混合物を DSC を使って加温した時、17 種すべてにおいて共融解に伴う吸熱ピークの後に、共結晶化に伴う発熱ピークが確認できることがわかった (結晶多形や水和物の転移でも発熱ピークが示すことあるが、本研究においては、そのような挙動を示さない API および CCF を選んで用いた)。これらの結果とは対照的に、過去に共結晶の報告が無い 3 種の組み合わせにおいては、発熱ピークは検出されなかった。DSC の結果の一例を Fig. 2 に示した。以上の結果は、物理的混合物を加温した場合、二成分系の相図に基づいて理論通りに発熱ピークとして共結晶の形成が確認できる、ということを示している。すなわち、DSC において発熱ピークの有無によって共結晶のスクリーニングへの応用が可能である、ということを示している。

また、いくつかの物理的混合物においては、発熱ピークのほかに複数の吸熱ピークが検出された。X 線 DSC を使った詳細な分析を実施したところ、これらの吸熱ピークは、準安定共融解、共融解、そして共結晶の融解に伴うものであることがわかった。一方、共結晶形成し得ない二成分の物理的混合物を加温した場合、共融解に伴う 1 つの吸熱ピークのみが DSC において観察された。さらに、メノウ乳鉢粉砕の前後で偏光顕微鏡観察および DSC の測定を実施した。その結果、Fig. 3 に示すように粒子径の違いにより、粉砕の前後で DSC 挙動が大きく異なることがわかった。熱的挙動を再現良く観察するためには、十分な粉砕による均一な物理的混合物を調製することが重要であるも明らかとなった。

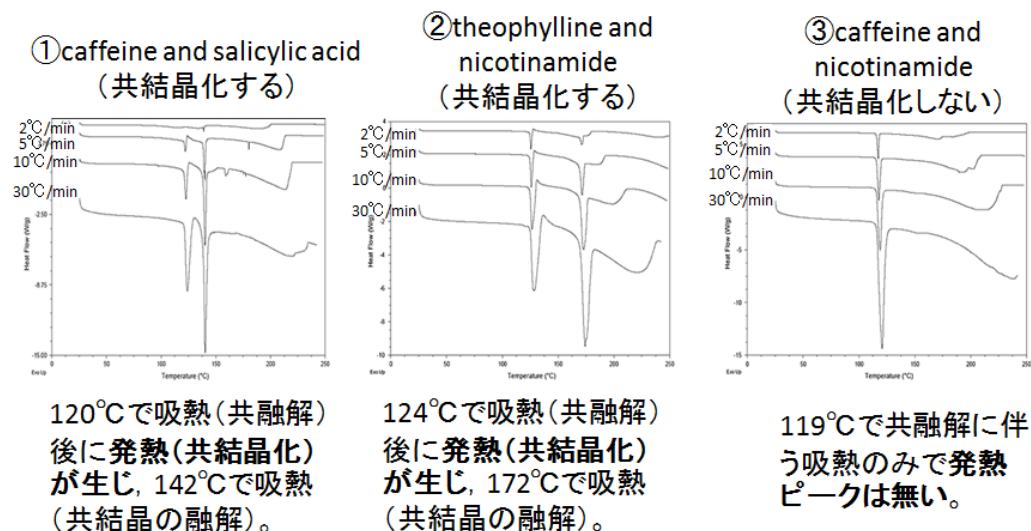


Fig. 2. DSCによる二成分系混合物の測定例

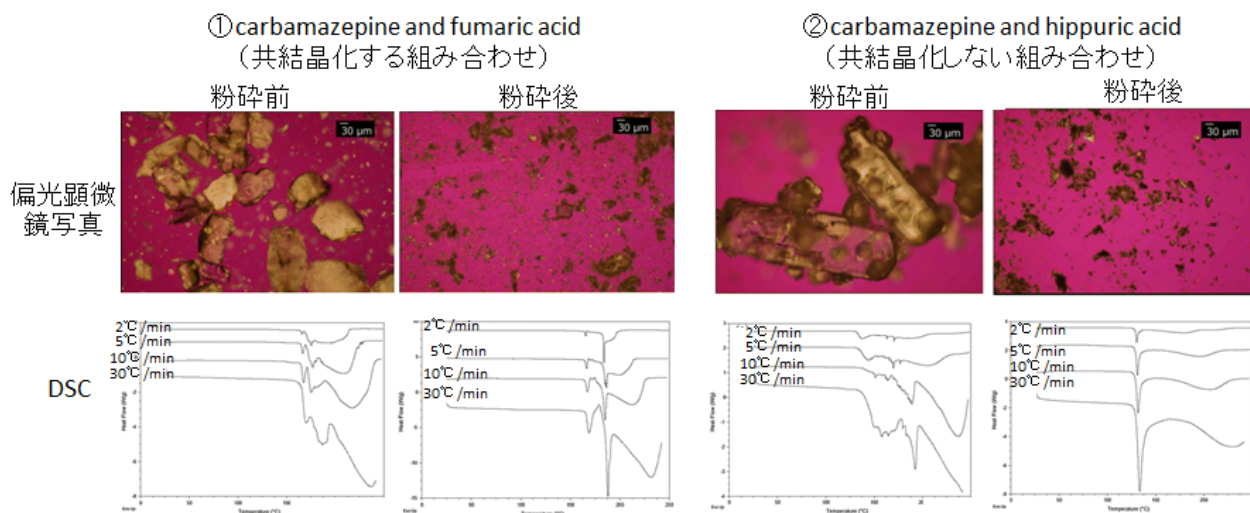


Fig. 3. 二成分系混合物の粉碎前後の偏光顕微鏡写真と DSC

【結論】

一連の検討により、物理的混合物における熱的挙動と相転移の関係、さらには、発熱と共結晶形成の関係が明らかとなった。また、DSCにおける吸発熱ピークにより、共結晶を形成しうかどうかの判断が可能であるということが示唆された。それゆえ、本手法および解釈に基づいた溶媒を用いない環境にやさしい、かつ、効率的な共結晶スクリーニング系の構築が可能であると考えられた。

第二部：二成分系の相図に基づく熱的手法による Coformer スクリーニング

【目的】

二成分系の相図に基づく熱的挙動を元に新しく、かつ、実際の創薬研究に利用できる Coformer スクリーニングの構築を試みた。

【方法】

API のモデル化合物として、Indomethacin (IND) と Tenoxicam (TEN) を用いた。また、Coformer としては、安全が高く、医薬品として開発可能と考えられる 42 種類の有機物を用いた。自動粉

体分注装置を用いて各 API を 10 mg を 96 ウェルプレートに分注したのち、42 種類の Coformer 等モル量を粉体分注した。そして、96 ウェル対応型のボールミル装置を用いて 5 分間の粉碎を実施し、均一かつ微細な粒子径の物理的混合物を調製した。各物理的混合物を 5°C/min および 30°C/min の 2 条件で DSC 測定を行った。DSC 測定の結果、発熱ピークもしくは複数の吸熱ピークが確認された物理的混合物をヒットとし、二次スクリーニングである X 線 DSC 測定 (昇温速度 2°C/min) を実施した。ブロードな吸熱ピークが確認された組み合わせも、複数の吸熱ピークが連続したためと判断し、二次スクリーニングを行った。X 線 DSC 測定の結果、新規の回折ピークが確認された場合に塩共結晶ができる組み合わせであると断定した。また、本研究では、一般的なスラリー法でのスクリーニングも実施し、本熱的手法の結果とスラリー法の結果、さらには過去の文献の報告結果との比較を行った。スラリー法では、スクリーニングで使用される一般的な有機溶媒 8 種/coformer の条件で、96 ウェルプレートを使用し、室温で 24 時間撹拌を行った。

【結果】

Indomethacin では、熱的手法とスラリー法、さらに過去の文献 (スラリー法) の結果を比較した場合、いずれもほぼ同様の結果を示した。IND と Nicotinamide の組み合わせにおいては、熱的手法ではヒットしなかったが、スラリー法や過去の文献では共結晶が見いだされていた。加温中における共結晶形成の速度論的障壁が高いことが理由として考えられた。こういう組み合わせにおいては、熱的手法よりもスラリー法のような溶媒を媒介する結晶化法の方がスクリーニングとして優れていると考えられた。一方、TEN の結果では、スラリー法はほとんどヒットしなかったのに対し、熱的手法では多くの塩共結晶を見出した。TEN は、有機溶媒への溶解性が低く、かつ、溶媒和物を形成しやすいという特徴があり、このことが本結果の原因と考えられた。こういう特徴をもつ API においては、本熱的手法がスクリーニングとして有効であるということが示された。また、TEN と Glycolic acid の物理的混合物においては、過去の文献で粉碎法にて共結晶が見いだされている事実に対し、熱的手法では本共結晶を見出すことができなかった。原因を精査したところ、TEN と Glycolic acid の準安定共融温度において融解後、共結晶が形成される前に、Glycolic acid が分解していることがわかった。それゆえ、熱的手法においては、準安定共融直後に分解するような API もしくは Coformer の場合、塩共結晶を見落とす可能性があることが示唆された。

【結論】

スラリー法と比較した場合、有機溶媒への溶解性が低い、もしくは、溶媒和物を形成しやすい API において、熱的手法は高いパフォーマンスを示すことがわかった。一方で、加温による塩共結晶形成の速度論的障壁が大きかったり、準安定共融後に分解する物理的混合物においては、そのスクリーニングとしての発見能力に課題があることもわかった。このような結果から、熱的手法とスラリー法は、Coformer スクリーニングにおいて補い合う相補的な関係にあると考えられた。

【まとめ】

二成分系の相図に基づき、共結晶の形成における熱的挙動とその意味が整理できた。また、本理論に基づく新しい Coformer スクリーニングを構築することができた。近年、有機溶媒への溶解性が悪い API が増えている。また、本熱的手法は、溶媒を使わない環境にやさしい技術であり、小スケールかつハイスループットである。それゆえ、本熱的手法による Coformer スクリーニングの実際の創薬の現場への応用およびその活躍が期待できる。

論文題目：共結晶の相図に基づく熱力学研究とスクリーニングへの応用

論文提出者：山下博之

新たに創製される原薬の溶解性、物理的安定性、その他の物性を改善するための一つの手法として共結晶がある。共結晶を形成するコフォーマーは、解離を必要としないため塩にくらべ数多くの選択肢がある。そのため、探索段階での共結晶スクリーニングは、工程数、必要なサンプル量、時間などが塩スクリーニングよりも煩雑になるため、より効率的なスクリーニング系が求められる。これまでにスラリー溶液法、超音波晶析法、蒸発法などが行われているが、溶解度差が大きい場合には原薬あるいはコフォーマーが単独で析出し、効率的なスクリーニング法とはなり得ない。また、粉碎法、溶媒添加粉碎法なども行われているが、サンプル量や時間を多く必要とし、必ずしも効率的ではない。これまでに共結晶研究として熱的手法については行われているが、定性的な研究であり、熱力学に基づいた詳細な検討までは行われていない。

本研究では、熱的手法による共結晶形成現象の体系的な解明を行った。さらに熱力学の原理に基づき科学的な共結晶スクリーニングの構築を行った。

本論文は2部から成る。以下それぞれの内容について述べる。

1 二成分系の相図に基づく物理的混合物の熱的挙動と共結晶形成の整理

共結晶を形成しない二成分系の相図は、共融点が認められるだけなのに対し、共結晶を形成する二成分系の物理的混合物の場合は、共結晶と各成分との間で共融点が認められるため複雑な挙動を示し、相図は congruent タイプ、incongruent タイプのものとして表わすことができる。この現象を示差走査熱量計(DSC)で測定するとチャート上に複雑な曲線を描くが、これらの曲線を解析することで、共結晶形成の有無が判断できることを解明した。すなわち、共結晶を形成する二成分の物理的混合物を DSC で加熱した場合、共結晶形成に伴う発熱ピークが複数の混合物で検出された。いくつかの物理的混合物においては、準安定共融解、共融解、共結晶の融解に伴う複数の吸熱ピークが確認された。一方、共結晶を形成しない二成分の物理的混合物を DSC で加熱した場合は共融解に伴う1つの吸熱ピークだけが観察された。

また、二成分の相図に基づく熱的挙動を観察するには、粒子を細かくして均一に混合することが重要であった。さらに昇温速度も大きく影響することが分かった。

2 二成分系の相図に基づく熱的手法によるコフォーマースクリーニング

本検討により解明した二成分系相図に基づく DSC 挙動を実際の共結晶スクリーニングに応用できるかどうかをインドメタシンとテオフィリンの2つをモデル薬物とし、42 の coformer を用いて検証した。テオフィリンのような有機溶媒に対する溶解度が低く、溶媒和結晶を形成し易い薬物に対しては、既存のスラリー法よりも高いパフォーマンスが得られた。一方、インドメタシンとニコチンアミドのように共結晶形成が遅い場合やテオフィリンとグリコール酸のように準安定共融温度付近で化合物が分解してしまう場合には適さないことが分かつ

た。すなわち、既に知られているスラリー法と熱分析法を組み合わせることで coformer スクリーニングをお互いに補い、確度の高い手法となることが分かった。本熱的手法は小スケール、ハイスループットであるため創薬研究に応用できるものであり、溶媒を使用せずグリーンな手法として創薬での有用性が期待できることが分かった。

以上述べたように、山下氏は、新たに提案されてくる候補化合物の物性改善手法として近年注目されている共結晶のスクリーニングについて、熱力学の基本となる共融現象をもとに理論を構築し、DSC を用いて詳細に検討した。その結果、共結晶を形成しない場合、congruent タイプの共結晶を形成する場合、incongruent タイプの共結晶を形成する場合の相図を DSC による吸熱、発熱の熱的現象から解析できることを明らかにした。また、本手法を用いて2つのモデル薬物とそれぞれ 47 の coformer を用い、効率よく共結晶形成の予測を行うことができることを明らかにした。ただし、熱的反応が遅い組合せ、加熱中に分解する組合せには適さないことも明らかとなり、既存の方法を組み合わせることで精度の高いスクリーニング法を確立した。

本熱的手法は、溶媒を使用しないグリーンなハイスループット共結晶スクリーニングとして創薬での有用性が十分に期待できる。

本テーマに関する学術論文を既に公表しており、博士（薬学）に値すると判断する。

2014 年 2 月 26 日

寺田勝英