

# 難水溶性薬物の物性最適化を志向した結晶形探索ならびにナノ共結晶化技法の確立

## Establishment of Rational Polymorph Screening System and Nano-Cocrystal Technology for Optimizing Physicochemical Properties of Poorly Water-Soluble Drugs

平成 28 年度 論文博士申請者 辛島 正俊 (Karashima, Masatoshi)

指導教員 深水 啓朗

近年、医薬品の探索プロセスにおいて、コンビナトリアルケミストリーを利用した合成展開と分子生物学的手法を用いたハイスループットスクリーニングによる化合物創出が主流となっている。その結果、新規医薬品候補化合物の多くはターゲット分子に対する高い親和性を有しながらも、化学構造がより複雑化し、分子量および脂溶性が上昇し、難水溶性を示す化合物が増加している。製薬企業で創製される新規候補化合物のうち、実に約 70%は難水溶性薬物であると言われており、難水溶性薬物への対処が医薬品開発上の重要課題として挙げられる状況である。<sup>1)</sup>

難水溶性薬物の開発上の課題として最も重要とされるのは、薬物の吸収性の確保である。経口投与された薬物を効率よく吸収させるためには、消化管内での溶解と吸収部位での膜透過が必要となるが、難水溶性薬物の場合は、溶解の段階で大きなハードルに直面することとなる。これを解消するためのアプローチとして、薬物分子の結晶形態を制御するクリスタルエンジニアリングあるいは製剤技術により可溶化を実現する手法の 2 つが挙げられる。前者は、塩や共結晶等の複合結晶化技術あるいはアモルファスおよび結晶形の制御を基軸としたアプローチであり、これにより原薬の溶解性や物理化学的性質を改善することが可能となる。後者は、シクロデキストリン等の可溶化剤、アモルファス（固体分散体）およびナノクリスタル等の確立された可溶化技術を利用したアプローチであり、医薬品開発において広く利用されている。しかしながら、これら既存の技術をもって、すべての難水溶性薬物

の物性を最適化できる訳ではなく、より確実な物性最適化方法の構築が強く望まれている。<sup>2)</sup>

クリスタルエンジニアリングにおいて、開発に適した物性を有する結晶形を見出すことは非常に重要である。結晶形を探索する方法は、結晶多形スクリーニング法として多く報告されているが、薬物の溶解度にかかわらず画一的なスクリーニング法を採用しているのが現状である。一方で、難水溶性薬物の中でも 200°C 以上の融点を示すような化合物は、水系溶媒のみならず、結晶多形スクリーニングで用いられる有機溶媒に対しても難溶性を示すことがある。そのような超難溶性薬物の場合、スクリーニング工程において、熱力学的な安定形を見落とすリスクが高まることから、安定形の効率的な探索方法の確立が強く求められる。そこで、本研究では、超難溶性薬物の熱力学的安定形を確実に見出すスクリーニング手法の確立を目的とし、slow cooling 結晶化法を用いた検討を実施した。

一方、可溶化製剤技術における課題の1つとして、適用する薬物の物性によって満足な可溶化製剤が設計できないこと、また設計できたとしても、溶解性・吸収性の向上において、満足なパフォーマンスを示さない可能性があることが挙げられる。例えば、ナノクリスタルは、結晶の微細化による溶解速度の飛躍的な向上が見込まれる一方で、その溶解度については、未粉碎結晶からの大幅な改善は期待できないことが一般的な理解である。<sup>3)</sup> それにより、ナノクリスタルによる吸収改善は他の可溶化技術に比べて限定的であることが多い。そこで、本研究においては、薬物単独のナノクリスタルではなく、カウンター分子 (CCF) との相互作用を利用した共結晶を設計することにより、溶解速度と溶解度の双方を改善可能な新規可溶化技術であるナノ共結晶を考案した。

#### **Slow cooling 結晶化法による難溶性薬物の結晶多形探索法**<sup>4)</sup>

一般的な結晶多形スクリーニング法として、スラリー熟成法、溶媒蒸発法、冷却晶析法、貧溶媒晶析法等が挙げられるが、いずれの手法も難溶性薬物の安定形結晶を確実に見出す方法としては十分でない。そこで、本研究では slow cooling 結晶化

法と名づけた手法を考案し、難溶性薬物への適用性を検証した。モデル薬物として、超難溶性薬物であるメベンダゾール (MBZ) を用いた。MBZ の結晶形としては、熱力学的な安定形である form A に加えて、準安定形である form B および C が報告されている。<sup>5)</sup> 晶析に用いる有機溶媒として、特性の異なる 13 種類の良溶媒および 3 種類の貧溶媒を選択し、網羅的な晶析実験を実施した。各良溶媒に対する飽和溶液を 55°C にて調製し、遅い冷却速度 (3°C/h) で 5°C までの冷却晶析を行い、晶析温度と結晶形の関係性を解析した。その結果、本法によって安定形である form A の晶析に加え、form B および form C も晶析された (表 1)。

得られた結晶形と晶析温度の相関を解析した結果、高温で form A が得られやすく、反対に低温では準安定形である form B あるいは C が晶出する傾向が示され、オストワルドの段階則に従う特性が認められた。すなわち、低過飽和度での結晶化を実現させることが、安定形結晶を得るのに有利であることが示され、slow cooling 結晶化法が、MBZ の安定形の晶析に適していることが実証された。

表 1 Slow cooling 結晶化法による MBZ の結晶多形スクリーニング結果

Solvents	Starting concentration (mg/mL) at 55°C	Resultant crystal forms (crystallization temperature, °C)						
		Single solvent	Antisolvents addition (1:1, v/v)					
			Water	n-Heptane		Isopropyl ether		
Methanol	1.51	A+B (52)	C*	-	-	A (50)		
Ethanol	0.87	A+B (50)	C (33)	A (52)	A+C (53)	A+B (47)		
2-Propanol	0.55	C (45)	C (5)	A (54)		C (45)		
2-Butanol	0.72	C (47)	-			A (51)		
Acetone	2.43	solvate (52)	C (43)	solvate*		solvate (53)		
MEK	1.85	B (53)	-	C*		A+C (54)		
Ethyl acetate	0.86	B (52)	-	C*		C (54)		
Acetonitrile	0.57	B (49)	B (12)	-		B (51)		
Toluene	0.08	A (49)	-	C*		A (6)		
Formamide	0.97	solvate (9)	C*	-		-		
THF	6.50	solvate (5)	solvate*	solvate+C*		solvate+C*		
Chloroform	0.90	B (22)	-	B*		C*		
TFE	2.33	B (20)	B*	-		B*		

\*: Crystallization by the antisolvent addition at 55°C.

-: Immiscible combination of solvent and antisolvent.

次に、結晶化挙動に及ぼす冷却速度の影響を調べるために、冷却速度を 4 水準設定し (1°C/h、3°C/h、10°C/h および急冷)、メタノール、2-プロパノールおよび酢酸エチルの飽和溶液からの晶析実験を行った。その結果、メタノールの 1°C/h でのみ、form A を単独で結晶化できたが、その他の条件では準安定形が優先的に結晶化

された。この結果より、冷却速度の低下は安定形晶析に有利に働くものの、溶媒種によってその傾向は異なり、溶媒と溶質の相互作用も結晶化挙動に影響を及ぼしているものと推察された。そこで、溶媒と溶質の相互作用を解釈するために、エタノール、2-ブタノールおよびそれぞれの n-ヘプタン混液 (1:1、v/v) を用いた結晶化誘導時間の測定による界面エネルギーの算出を試みた。各溶媒に対して、4 水準の過飽和度を設定し、25°C での結晶化時間を測定した結果をプロットした (図 1)。プロットの傾きから算出した界面エネルギーは、それぞれ、2.94、2.49、2.80 および 1.90 mJ/m<sup>2</sup> となり、エタノールおよび 2-ブタノールのいずれに対しても n-ヘプタンの添加により、溶媒と溶質間における界面エネルギーの低下が示された。この結果と、slow cooling 結晶化法の結果 (表 1) を照合すると、エタノール/n-ヘプタンおよび 2-ブタノール/n-ヘプタンでは、それぞれの単一溶媒に対して、晶析温度が上昇し、且つ form A が単独で結晶化していることから、n-ヘプタンの添加による界面エネルギーの低下が結晶化温度を上昇させ、安定形晶析に有利に働いたことが推察された。

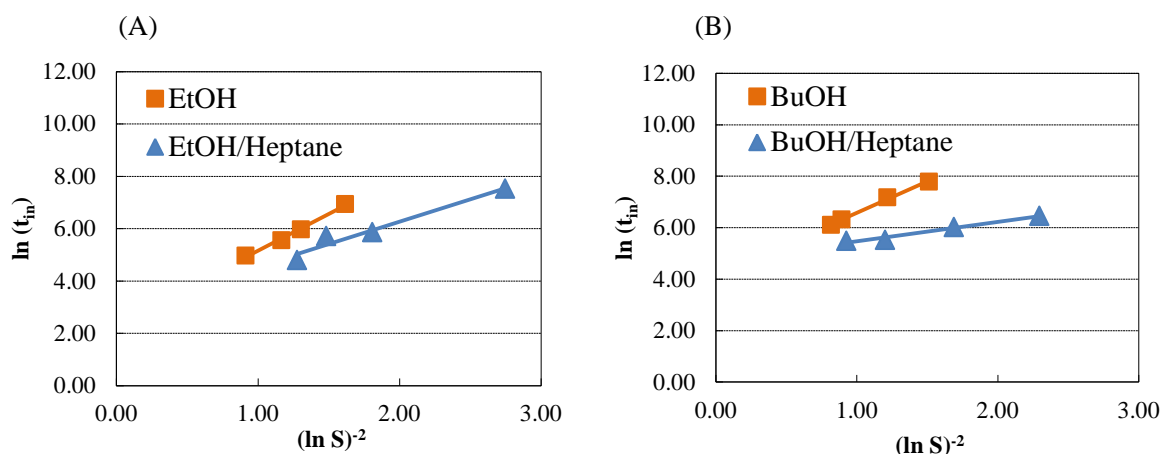


図 1 MBZ の各種溶媒中での過飽和度－結晶化時間プロット。  
(A) EtOH および EtOH/heptane、(B) 2-BuOH および 2-BuOH/heptane

以上の結果より、様々な特性を有する良溶媒と貧溶媒を用いた slow cooling 結晶化法は、難溶性薬物の熱力学的安定形の晶析を可能とし、開発に適した物性を有する結晶形の探索に有用であることが示された。

## ナノ共結晶技法による難水溶性薬物の新規可溶化技術<sup>6)</sup>

ナノ共結晶の調製に用いるモデル共結晶として、インドメタシン (IMC) - サッカリン (SAC)、カルバマゼピン (CBZ) - サッカリン (SAC) およびフロセミド (FSD) - カフェイン (CAF) を使用し、湿式粉砕法でのナノ共結晶化を試みた。共結晶の粉末を安定化剤であるヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) およびラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液中に分散し、ジルコニアビーズを用いて湿式粉砕することにより、IMC-SAC、CBZ-SAC および FSD-CAF 共結晶の結晶構造を維持したままでナノオーダー (平均粒子径 300 nm 未満) にまで微細化されたナノ共結晶懸濁液を調製することが可能であった。一般に、湿式粉砕においては、水素結合等の弱い結合力で形成された共結晶は、構成成分が解離してしまうことが予測されたが、本研究で利用した安定化剤の組成および粉砕条件が共結晶へのメカニカルストレスを軽減し、共結晶の微細化に適することが推察された。

調製したナノ共結晶の機能および開発可能性を調査するために、ナノ共結晶の溶出性および安定性を評価した。溶出性は、日局崩壊試験第 1 液 (JP1) 中にナノ懸濁液を分散させた後、温度 37.0°C、パドル回転数 50 rpm で試験した。試料溶液は孔径 0.02  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターを用いて、サンプリングを実

施した。その結果、ナノ共結晶は薬物単体のナノクリスタルに比べて、溶出速度および溶解度が顕著に改善されることが示された (図 2: FSD-CAF ナノ共結晶懸濁液の溶出プロファイル)。また、それぞれのナノ共結晶懸濁液は、未粉砕の共結晶粉末を分散媒水溶液 (HPMC+SDS) に分散させた懸濁液に対しても、優位な溶出性を示し、既存の可溶化技術 (ナノクリスタルあるいは共結晶) では到達できないレベ

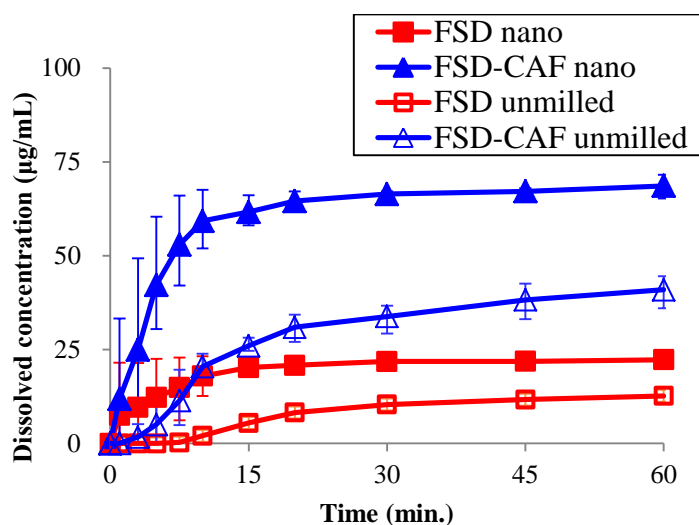


図 2. FSD-CAF ナノ共結晶、FSD ナノクリスタル および各未粉砕懸濁液の溶出プロファイル。

ルの溶出改善効果を達成した。

安定性評価の結果から、ナノ共結晶懸濁液は 5°C および 25°C の保存条件下において、物理的および化学的に安定であり、少なくとも 3 ヶ月間は粒子径、ゼータ電位、化学的純度および結晶形に変化は認められず、医薬品開発において利用可能であることが示唆された (表 2 : FSD-CAF ナノ共結晶懸濁液の安定性)。

以上の結果より、新たに開発したナノ共結晶化技法は溶出性の観点から既存の可溶化製剤を上回るパフォーマンスを示し、医薬品開発に適用可能な安定性を有することが明らかとなった。これら一連の研究により、本技法が難水溶性薬物の物性を最適化するために、非常に有用な選択肢の一つとなり得ることを示した。

表 2 FSD-CAF ナノ共結晶の安定性データ

FSD-CAF	initial	5°C 1M	5°C 3M	25°C 1M	25°C 3M
Mean particle size (nm)	194	194	194	200	195
PDI	0.229	0.216	0.215	0.214	0.203
Zeta potential (mV)	-26.2	-21.3	-20.8	-24.7	-21.8
Crystal form	FSD-CAF	-	FSD-CAF	-	-
Purity (%)	99.9	-	99.7	-	99.6

## 総括

本研究では、難水溶性薬物の開発における課題に着眼し、既存の結晶形探索における課題および可溶化製剤技術における課題に対して、独自に見出した技術である slow cooling 結晶化法およびナノ共結晶化技法を駆使して、それらを解決する手段を実現した。

## 参考文献

- 1) Di Maio S., Carrier R. L., *J. Control. Release*, **151**, 110-122 (2011).
- 2) Brough C., Williams III R. O., *Int. J. Pharm.*, **453**, 157-166 (2013).
- 3) Kesisoglou F., Panmai S., Wu Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 631-644 (2007).
- 4) Karashima M., Kimoto K., Kojima T., Ikeda Y., *J. Cryst. Growth*, **390**, 30-37 (2014).
- 5) Charoenlarp P., Waikagul J., Muennoo C., Srinophakun S., Kitayaporn D., *J. Trop. Med. Public Health*, **24**, 712-716 (1993).
- 6) Karashima M., Kimoto K., Yamamoto K., Kojima T., Ikeda Y., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **107**, 142-150 (2016).