

カルバペネム系抗生物質の 結晶多形現象と晶析操作

2023 年 9 月

大阪市立大学大学院

工学研究科

まつうら しんじ
松浦 伸治

第 1 章 緒論	1
1.1 低分子医薬品の製造プロセスと晶析操作.....	1
1.2 医薬品原薬と多形.....	1
1.3 多形とその物理的・化学的安定性.....	3
1.4 晶析操作で重要な現象.....	4
1.4.1 古典的核形成理論に基づく核形成速度.....	4
1.4.2 多形と溶解度.....	5
1.5 結晶多形の溶媒媒介転移.....	7
1.6 貧溶媒晶析による多形の数論的研究.....	8
1.7 医薬品原薬の多形制御と溶媒和物結晶.....	9
1.8 医薬品化合物の固相転移.....	9
1.9 β -ラクタム構造を有するカルバペネム系抗生物質.....	10
1.10 本研究の目的.....	11
第 2 章 加水分解抑制を目的とした CS-023 の多形制御	17
2.1 緒言.....	17
2.2 実験方法.....	17
2.2.1 晶析実験.....	17
2.2.2 核化誘導時間 (t_{ind}) の測定.....	18
2.2.3 CS-023 の溶液および固体の安定性実験.....	20
2.2.4 熱分析.....	20
2.2.5 結晶多形の分析.....	21
2.2.6 加熱ステージ偏光顕微鏡による観察.....	21
2.2.7 水およびエタノールの吸着等温線の測定.....	21
2.3 結果と考察.....	23
2.3.1 冷却晶析により得られた多形とその固相転移挙動.....	23
2.3.2 水溶液及び医薬品原薬の多形としての Form H の CS-023 の安定性.....	28
2.3.3 貧溶媒晶析で得られる多形.....	34
2.3.4 Form A からの Form H への固相転移.....	39
2.4 結言.....	47
第 3 章 エタノール水溶液から析出する新しい多形	49
3.1 緒言.....	49
3.2 実験方法.....	49
3.2.1 晶析実験.....	49
3.2.2 単結晶 X 線回折による結晶構造の決定.....	50
3.2.3 単結晶の顕微ラマンスペクトル測定.....	51

3.2.4	粉末 X 線回折 (XRD) 分析.....	51
3.2.5	水とエタノールの吸脱着による転移実験.....	52
3.3	結果と考察.....	53
3.3.1	70 v/v%エタノール下での CS-023 の結晶化.....	53
3.3.2	エタノール水溶液中の CS-023 の多形.....	54
3.3.3	Form C の水の吸脱着特性.....	56
3.3.4	70 v/v%エタノール溶液から析出する CS-023 結晶の洗浄と乾燥.....	60
3.3.5	70 v/v%エタノール溶液から回収した CS-023 結晶の洗浄および乾燥の改善.....	66
3.3.6	適切な洗浄と乾燥による 70 v/v%組成以下のエタノール水溶液中での貧溶媒 晶析による Form C の取得.....	68
3.3.7	FormA と Form C の関係.....	69
3.4	結言.....	72
第 4 章	固相転移のメカニズムに関する検討.....	74
4.1	緒言.....	74
4.2	実験方法.....	75
4.2.1	Form H と Form A の単結晶の作製.....	75
4.2.2	単結晶 X 線回折による結晶構造の決定.....	75
4.2.3	熱分析.....	76
4.2.4	Form C の相転移挙動実験.....	76
4.2.5	Form C の電子密度等価面の作成.....	76
4.3	結果と考察.....	77
4.3.1	Form C の相転移挙動.....	77
4.3.2	CS-023 の多形相関図.....	82
4.3.3	Form A、Form C、Form H の結晶構造の比較.....	84
4.3.4	Form C から Form H への固相転移.....	88
4.3.5	Form A から Form H への固相転移.....	91
4.4	結言.....	94
第 5 章	結論.....	97

第1章 緒論

1.1 低分子医薬品の製造プロセスと晶析操作

低分子医薬品の製造プロセスは、他の化学物質と同様に、反応、抽出、濃縮、晶析、固液分離、乾燥からなる単位操作で構成される。医薬品の晶析操作は、反応の副生成物から化合物を単離する精製プロセスであり、溶液中に溶解している溶質を、冷却、蒸発、貧溶媒添加、中和などによって、目的物質と副生成物との溶解度の差を大きくし目的の結晶を得る操作である。さらに、晶析は目的の特性を持った結晶を再現よく製造する技術である。なぜなら、多くの医薬品の最終形態は結晶であり、粒子径、多形、結晶形状が「くすり」としての効き目や安定性に直接影響を及ぼすからである。

1.2 医薬品原薬と多形

医薬品原薬（API: Active Pharmaceutical Ingredient）の形態は結晶もしくは非晶質（アモルファス）であり、結晶は単一成分で構成されるフリー体と多成分から構成される塩、共結晶、水和物結晶・溶媒和物結晶などに分類される（Figure 1-1）¹⁾。結晶には同一成分でありながら、分子の立体配座（コンフォメーション）や充填構造（パッキング）が異なり、物理化学的性質の異なるものが存在し、それらを多形と呼ぶ。水和や溶媒和によって生じる多形は擬似多形と呼ばれるが、広義にはこれらも多形とみなされる²⁾。そして、医薬品原薬の開発では、高い頻度で多形や擬似多形が現れ³⁾、各々の多形は融点、溶解性、吸湿性、バイオアベイラビリティ、安定性などの物理化学的性質が異なる⁴⁾。開発初期においては、薬効が期待されるリード化合物から物性や薬物動態を改善することを目的に合成展開⁵⁾が行われる。*in vitro* で薬効・薬理試験に必要な化合物は、試験管レベルの mg スケールで製造され、クロマトグラフィーで分離精製される。そして、濃縮乾固により固体を得る方法が一般的であるが、得られた固体の形態

は結晶ではなくアモルファスであることも多い。アモルファスは、結晶に比べて熱力学的に不安定であり、一般的には分解が速い。そのため、低温での保管が必要になるなど、貯蔵方法に課題がある。薬効が期待される化合物であっても、医薬品としては適さないと判断され、開発候補品から除外される場合もある。そのため、熱力学的に安定な結晶を得ることを目的として、様々な方法で結晶化が試みられる^{6,7,8)}。そして、前臨床試験の薬理試験・毒性試験の段階で原薬の形態を決定し、目的とする原薬形態を製造するために、パイロットスケールで晶析が行われる。しかし、結晶が得られた後も多形の課題が存在する。例えば、医薬品開発の途中または上市後に新たな多形が見つかり、開発計画に影響を及ぼすだけでなく、販売中止となれば社会的にも影響を及ぼす場合がある^{9,10)}。そこで、析出する可能性のある多形は早期に網羅する必要がある。従来は手動で多形の探索が行われていたが、現在は機械による mL スケールでのハイスループットスクリーニング¹¹⁾やアモルファスからの溶媒蒸気拡散法などによるスクリーニングが行われている。

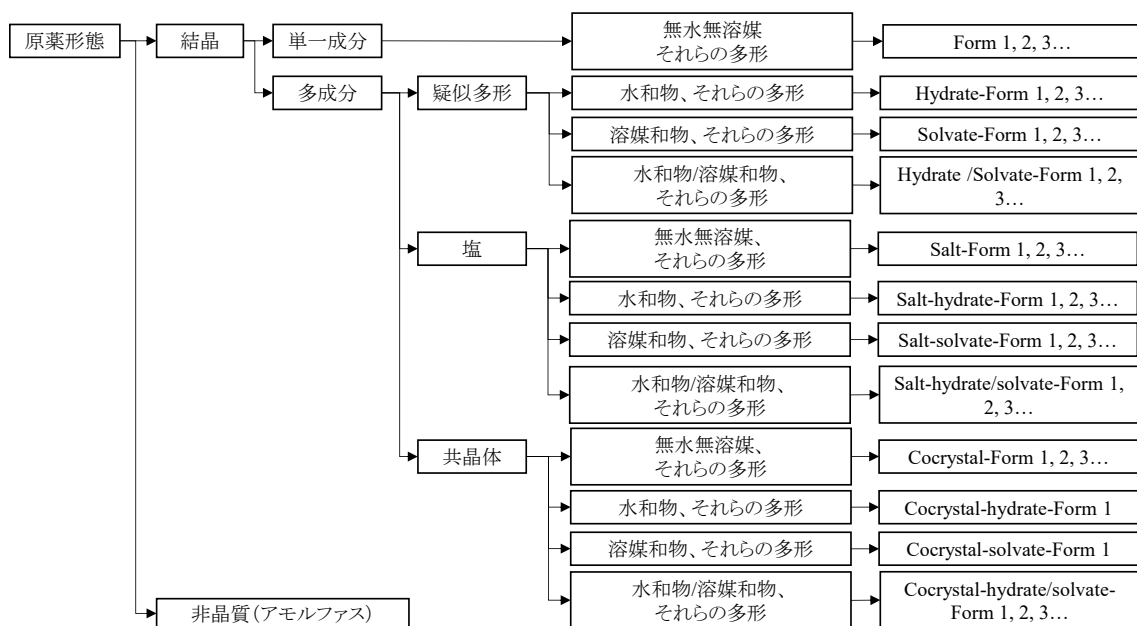


Figure 1-1 The solid forms of APIs¹⁾

1.3 多形とその物理的・化学的安定性

無水無溶媒結晶の多形や、疑似多形として知られる水和物結晶は、その溶解性やバイオアベイラビリティが異なることが知られている。晶析中に疑似多形が現れることは一般的な現象である。医薬品原薬中の有機溶媒成分は治療に寄与しないため、医薬品適正製造基準（GMP）、医薬品規制調和国際会議（ICH Q3C）¹²⁾、その他の品質基準に従い、一定レベル以下に抑制されるべきである。ICH Q3C によると、例えば、エタノールは 0.5 wt%未満に抑える必要があり、このような規制は製品品質と安全性を保証するために重要である。

新規有効成分を含む医薬品の承認申請には、温度、湿度、光などの環境要因による品質の経時的変化を評価する安定性試験が必要である。これは、使用期限及び貯蔵条件の設定にも役立つ。また、医薬品に対する安定性試験では、温度によって薬物の多形が変化していないかが調べられる。様々なスクリーニングを通じて得られた多形の適切性は、多様な試験評価を経て判断される。しかし、選定された多形が所望の安定性を持つかどうかの予測は困難であり複雑である。

多形の物理的安定性に関する研究例は多い^{13,14,15)}。一般に熱力学的に安定な多形は化学的にも安定であることが多く、化合物が分解されにくい。これは、結晶構造内の分子が水素結合やそれ以外の結合によって最適化された充填構造になるからと考えられる。そのため、熱力学的に有利な多形は密度が高い。

製剤化においては、化学的不安定性を最小限に抑える賦形剤とプロセスの選択が重要である。準安定多形やアモルファスは、薬物の最安定な多形よりも化学的安定性が低い場合があるが、適切な処方を通じて化学的安定性を最大化することが可能な場合もある^{16,17)}。したがって、準安定晶またはアモルファスの化学的安定性が低いことが、製品としての開発を妨げるわけではない。製造では安定晶が好ましいが、準安定晶は溶解性に優れるため、製薬企業において医薬品原薬の多形選定は、重要な問題である。そし

て、所望の多形が選定された場合でも、工業的な製造方法を確立するためのスケールアップリスクを考慮し、より詳細な操作条件の検討が行われる¹⁸⁾。しかし、その検討中に別の多形が出現することもあり、所望の多形を確実に取得する方法を確立するには多くの検討を要する。

1.4 晶析操作で重要な現象

1.4.1 古典的核形成理論に基づく核形成速度

晶析中の重要な動力学的物理現象は、核形成と結晶成長であり、過飽和が核形成と結晶成長の推進力である。過飽和は、過飽和状態 (μ) と飽和状態 (μ^*) の溶質分子の化学ポテンシャルの差であり、式 (1-1) のように表せる¹⁹⁾。

$$\frac{\Delta\mu}{kT} = \mu - \mu^* = \ln\gamma C - \ln\gamma^* C^* = \ln\frac{C}{C^*} \quad (1-1)$$

ここで、 k はボルツマン定数、 T は温度である。理想溶液では、活量係数 γ は 1 と等しく、狭い濃度範囲では一定とみなせる。過飽和比を S で表すと式 (1-2) で表せる。

$$S = \frac{C}{C^*} \quad (1-2)$$

C は溶液中の溶質の濃度、 C^* はその飽和または平衡濃度であり、この比率は無次元である。ここで、 $S > 1$ の場合、結晶は成長し、 $S < 1$ の場合、結晶は溶解し、 $S = 1$ の場合は、結晶と溶液は平衡状態にある。

溶液が過飽和になると、成長条件（温度、過飽和度、攪拌方法）に応じて、固相が形成されていく。溶液から結晶核が生じることは一次核形成と呼ばれ、種晶の存在によって結晶核が生じることは二次核形成と呼ばれている。そして、一次核形成の中でも、純粋に溶液中から析出する核形成は均一核形成と呼ばれ、結晶核が晶析装置の壁面、攪拌翼、または固体粒子（ダスト粒子など）などの表面上に優先的に形成される核形成は不均一核形成と呼ばれている。

古典的核形成理論から、核形成速度または核形成頻度 J すなわち、単位時間および単位体積あたりの過飽和溶液中に形成される結晶の数は次式(1-3)、(1-4)のように表される^{20,21)}。

$$J = nN_0v \quad (1-3)$$

$$v = \exp\left(-\frac{16\pi\gamma^3v_0^2}{3k^3T^3(\ln S)^2}\right) \quad (1-4)$$

J は、単位体積あたりの分子数 N_0 の n 倍に比例し、 v は臨界サイズ r^* 以上の核が、溶液中の分子から固体として結晶に成長して核形成する頻度である。核形成の頻度は、過飽和 S だけでなく分子の濃度 N_0 にも依存し、分子間接触頻度が高くなるほど、核形成する可能性が高くなり、核形成が容易になる。濃度が高い場合はこの条件を満たすが、低い場合、溶質分子は溶媒分子によってより長い距離に離される。したがって、濃度が低い場合は、分子が接触して核を形成する確率は低くなる。

1.4.2 多形と溶解度

まず、2つの多形 I と II で構成される 2 成分系を考え、特定の温度では、多形 II は多形 I よりも安定しているとする、多形 I は、自由エネルギー G が低くその化学ポテンシャル μ_{II} も低い。固相が飽和溶液と接触している平衡状態では、化学ポテンシャルは固相と液相の双方の成分で等しいため、式(1-5)、(1-6)で表される。

$$\mu_{\text{I,solid}} = \mu_{\text{I,solution}} = \mu^0 + RT \ln a_{\text{I,solution}} \quad (1-5)$$

$$\mu_{\text{II,solid}} = \mu_{\text{II,solution}} = \mu^0 + RT \ln a_{\text{II,solution}} \quad (1-6)$$

ここで、 μ^0 は標準化学ポテンシャル (J mol^{-1})、 R は気体定数 ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) である。 $a_i = \gamma_i C_i^*$ であり、 γ_i は活量係数、 C_i^* は固相 I または II と平衡状態にある溶液中の成分 i のモル濃度で表される。最も安定した多形の溶解度が常に最も低く、その逆、すなわち最も不安定な多形の溶解度が常に最も高い。

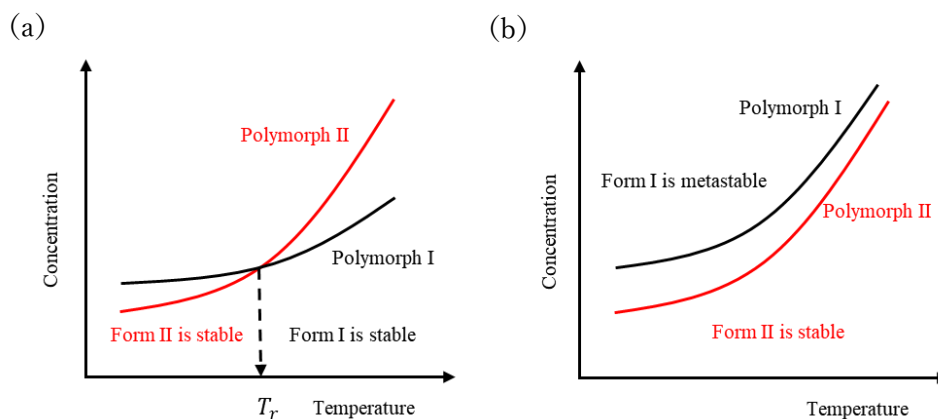


Figure 1-2 Solubility curves for a system with two polymorphic forms: (a) Enantiotropic systems, (b) Monotropic systems

多形間の関係を知るためには、結晶化を行う溶媒に対してすべての多形の溶解度を測定することが最良の方法であり、溶液中で最も安定な多形を調べることは、多形の制御方法を決める重要なデータを取得する迅速な方法である。

Figure 1-2には、2つの多形間で、考えられる2つの関係を示している。1つ目は、溶解度曲線が多形 I および II の融点よりも低い温度で交点 (T_r : 転移温度) が現れるケースであり、この系は互変形と呼ばれる。Figure 1-2(a)に示すように、多形 II は T_r 以下では溶解度が低く、この温度の範囲まで安定して存在する。逆に、転移温度を超えると、多形 I は安定した多形となり、多形 II は準安定な多形である。

2つ目は、溶解度曲線が溶液中で互いに交差しないケースであり、この系は単変形と呼ばれ、Figure 1-2(b)に示すように、広い温度範囲で多形 II が安定な多形である。

溶液中の化合物の溶解度データを測定した後、温度の逆数 $1/T$ (K^{-1}) に対して、溶解度 C^* (モル分率) の対数をプロットし、Figure 1-3 のように溶解度曲線を線形化すると、その結晶の溶解度は固有の傾きを持った直線を示す。2成分系でそれぞれの結晶の溶解度曲線が明らかになると、2つの異なる傾きを持った直線が現れる。この系では、

Figure 1-3(a)にプロットした曲線は直線になり、直線の交点である T_r が現れる。ある多形の溶解度曲線を取得した時、その溶解度曲線のファントホフプロットを行って直線とならない場合、つまり、異なる勾配となる溶解度曲線が現れた場合は、測定した時間の中に、最初に得た多形以外の異なる多形が現れた可能性がある。溶解度曲線を得てファントホフプロットした傾きを評価することは、溶解度測定中に現れた可能性のあるいくつかの相（多形、溶媒和物など）の存在を調べる方法として実用的である^{22,23,24}。

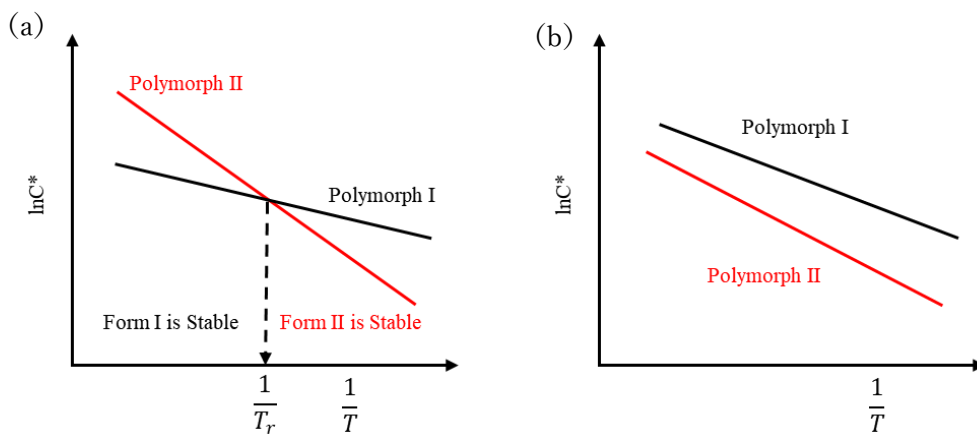


Figure 1-3 van't Hoff plots of two polymorphic forms: (a) Enantiotropic systems, (b) Monotropic systems

1.5 結晶多形の溶媒媒介転移

一般的に、準安定晶と安定晶の多形が存在する場合、準安定晶が先に析出し、遅れて安定晶が析出する²⁵。安定晶の核形成とその成長が進行するに伴い、準安定晶が溶解して消滅する現象を溶媒媒介転移と呼ぶ²⁶。Figure 1-4 に溶媒媒介転移がない場合とある場合の典型的な溶質の濃度変化を示す。溶液中で析出する多形が一つで、溶媒媒介転移がない場合は、所定の待ち時間の後に結晶が析出し溶液濃度が低下して準安定晶の溶解度に到達する。一方、溶媒媒介転移がある場合は、まず、準安定晶の析出終

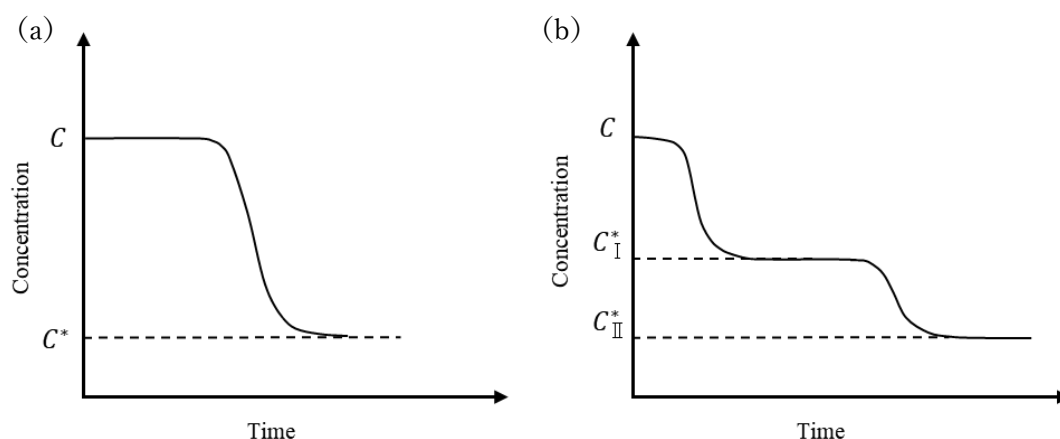


Figure 1-4 Concentration profile of crystallization: (a) One crystal form, (b) In the presence of polymorphs

了に伴い準安定晶の溶解度で溶液濃度が溶解度に達する。次に、安定晶の核形成と成長が起こるが、安定晶の析出によって減少するはずの溶液濃度は、準安定晶の溶解で補われるため、安定晶の析出が始まっても溶液濃度は準安定晶の溶解度のままである。準安定晶がすべて溶解すると、再び溶液濃度は減少し始め安定晶の溶解度に達する。そのため、所望の多形を取得するためには、溶媒媒介転移を理解しておくことが重要である。

1.6 貧溶媒晶析による多形の速度論的研究

貧溶媒晶析は、溶質が溶解した溶媒（良溶媒）に、溶質の溶解度が低く良溶媒に混和する溶媒（貧溶媒）を添加することによって溶質を結晶化させる方法である。一定温度での晶析が可能であり、濃度差を大きくするために冷却晶析のように加熱により高い温度にする必要がない。そのため、温度に対して不安定で分解する化合物に対しては、分解の抑制が期待される。また、単一溶媒では温度による溶解度差が小さい物質に対しても、適切な溶媒選定により溶解度差が大きくできる場合にも貧溶媒晶析は有用である。そのため、貧溶媒晶析について様々な研究が行われている^{27,28,29)}。

1.7 医薬品原薬の多形制御と溶媒和物結晶

医薬品原薬の多形は慎重に設計されているが、医薬品原薬の溶液の精製によって目的の開発多形が現れなくなった事例がある。例として、医薬品原薬の合成において副生成物（二量体）を除去したことで、未知の安定晶が出現したことがある³⁰⁾。岡本らも同様の現象を報告している³¹⁾。彼らは、医薬品原薬の結晶形開発の最終段階で開発候補となる新たな多形を発見した。開発の初期から開発の後期かけて精製方法が見直され、中間体濃度を 0.4%以下まで除去したことが原因と報告している。また、他にも多くの多形の消失現象^{32,33)}や多形の再出現現象^{34,35,36)}が報告されている。

医薬品原薬は、原薬の結晶として同一成分を安定的に製造する必要がある。したがって、多形の制御は非常に重要である。しかし、結晶中の水および溶媒は常に医薬品原薬分子と安定した相互作用を形成するわけではない。例えば、シナカルセト塩酸塩の 4 種の単一溶媒和物結晶は、母液から取り出すと脱溶媒して同じ無溶媒和物結晶に転移した³⁷⁾。また、医薬品原薬の水和物結晶に関し、水和および溶媒和が非化学量論的な関係になることが、三村によって議論されている³⁸⁾。その他にも、溶媒和物結晶の医薬品原薬結晶の洗浄中に脱溶媒するリスクが Douillet³⁹⁾らによって明らかにされている。溶媒和物結晶の研究例を紹介したが、特定の多形の溶媒和物結晶の化学組成は溶液での結晶化中に特定することが困難であるという基本的な問題が残っている。

1.8 医薬品化合物の固相転移

安定晶はその環境中での安定な多形であり、溶液中の安定晶と大気中の安定晶とは必ずしも同一とは限らない。固相転移とは化合物が固体として存在する状態で、その結晶構造や物性が変化する現象を指しており、これは物質が固相から別の固相へ移行する過程で生じる。医薬品ではその結晶構造の変化が薬物の安定性や溶解性、薬物動

態などに影響を与える可能性があるため、固相転移は非常に重要である。このような転移は、物質が温度、圧力、湿度、または添加物の影響を受けることで生じる。例えば、医薬品の水和物結晶が乾燥した環境下に置かれると無水物結晶に転移して、溶解度や吸収性に影響を与える場合がある。このような固相転移が起こると、医薬品の製造や安定性評価に影響を及ぼす可能性がある。そのため、固相転移を理解し、それが品質や効果に及ぼす影響を評価することが重要である。さらに、製造工程や保管条件、または製剤としての安定性などを確保するためには、このような固相転移の理解が欠かせない。溶液中の安定晶だけでなく、大気環境下の様々な相対湿度に対し、安定晶として保持できる相対湿度について研究が行われている⁴⁰⁾。しかし、有機溶媒を含有する溶媒和物結晶の固相転移は、アキシチニブの例^{41,42)}のように溶媒によって脱離のしやすさが異なり、結晶の固相転移に使用する溶媒選定に多くの労力がかけられることがある。

1.9 β-ラクタム構造を有するカルバペネム系抗生物質

β-ラクタム構造をもつ抗生物質は、よく水和物として結晶が取得される。Hickey らは、Physician's Desk References (2006) に基づき、市販されている β-ラクタム系化合物 (セファロスポリンやペニシリンなど) の約 45% が水和物の結晶であると報告した⁴³⁾。カルバペネム系医薬品でも、メロペネム⁴⁴⁾は三水和物結晶、イミペネム⁴⁵⁾は一水和物結晶であり、ドリペネムの多形は、無水物結晶、一水物結晶、三水和物結晶として存在する⁴⁶⁾。β-ラクタム構造をもつ抗生物質は、水溶液中では環状 (4 員環) ひずみがあるため化学的に分解しやすい⁴⁷⁾が、結晶状態では水和物であっても加水分解せずに安定である⁴⁸⁾。このことは、結晶中の β-ラクタム構造の近傍に加水分解する水がない可能性を意味している。しかし、水和物結晶を得るには水を含む溶液からの晶析が不可欠であり、その過程で分解する恐れがある。そのため、できるだけ分解を抑制した晶

析方法が望まれる。Vangala らは、抗細菌薬ニトロフラントインと 2-ピリドンまたは 4-アミノベンズアミドの共結晶の溶媒和物結晶から、脱溶媒によって新規の無水物の共結晶を生成することを見出した。彼らは、共結晶の溶媒和物結晶の製造が無水物の共結晶を製造する代替ルートとなり得ることを示した⁴⁹⁾。この提案は、不安定な β -ラクタム化合物に適した結晶化法が存在する可能性を含んでいる。

1.10 本研究の目的

本研究では、医薬品の物理化学的特性を評価する手法と共に、安定的な医薬品原薬の多形制御方法を確立することを目指した。具体的には、モデル化合物として、 β -ラクタム構造を有するカルバペネム系抗生物質 CS-023 を使用し、上記の評価手法や制御方法に役立つ新たな提案を目的とした。CS-023 はカルバペネム系合成抗菌薬候補化合物として創製された化合物^{50,51)}である (Figure 1-5)。CS-023 は、他のカルバペネム系抗生物質と比べて、体内における半減期が長い。しかし、製造条件によっては分解しやすいため、安定的な製造が難しい課題があった。そして、開発段階では判別が難しい多形が存在し、医薬品原薬の候補となる多形の選定が困難であった。そこで、本化合物の多形の物理化学的性質や、晶析中の溶媒媒介転移および固相転移挙動を明らかにして、所望の多形を製造できる技術の確立を目的とした。

本論文は、全 5 章から構成されている。

第 2 章では、水溶液からの冷却晶析による水和物結晶の取得を試みた。その結果、

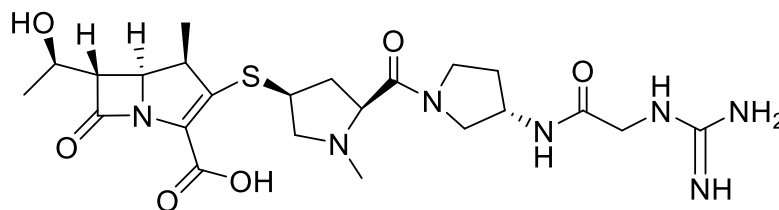


Figure 1-5 Chemical structure of CS-023

医薬品として適している水和物結晶を取得した。しかし、水に溶解した CS-023 の加水分解が著しいことがわかった。そこで、安定的に製造する晶析法について検討した。80 v/v%エタノールを用いた貧溶媒晶析を試みたところ新たな溶媒和物結晶を得た。この溶媒和物結晶を固相転移させることにより水和物結晶を製造することに成功した。

第 3 章では、貧溶媒晶析で得られた結晶が、安定的な製造が保証されるエタノール組成の範囲を決定するために、70 v/v%エタノール以下の組成における貧溶媒晶析を試みた。しかしながら、結晶に含まれるエタノールと水の含量が一定にならない課題が顕在化した。そのため、洗浄や乾燥の工程を介さない方法を用い、貧溶媒晶析で析出した単結晶の X 線回折分析を行った。X 線回折分析から構造解析し、特定された結晶は別の溶媒和物結晶であることがわかった。そして、この多形が安定晶で、第 2 章で得られた溶媒和物結晶は準安定晶であることがわかった。安定晶である溶媒和物結晶のエタノールと水の含量が一定にならないことを調べるために、水溶液中で多形の変化を調べたところ、水溶液中では、水和物に徐々に変化することがわかった。次に、結晶洗浄溶媒組成と乾燥方法が多形に与える影響について詳細に検討し、エタノール水溶液中の安定晶である溶媒和物結晶を確実に製造する方法を確立した。

第 4 章では、安定晶の溶媒和物結晶から水和物結晶を取得する方法を検討した。そして、液相を介さない固相転移によって水和物結晶を取得することに成功した。さらに、固相転移のメカニズムについて検討した。単結晶構造解析に成功した準安定晶と安定晶の溶媒和物結晶と水和物結晶の結晶構造を比較し、準安定晶の溶媒和物結晶から水和物結晶へ固相転移するメカニズムと、安定晶の溶媒和物結晶から水和物結晶に固相転移するメカニズムについて考察した。

第 5 章では、結論として、固相転移を中心に CS-023 の多形制御に関する研究成果をまとめた。

参考文献

- 1) Aitipamula, S., Banerjee, R., Bansal, A., Biradha, K., Cheney, M., Choudhury, A. R., Desiraju, G. R., Dikundwar, A., Dubey, R., Duggirala, N., Ghogale, P. P., Ghosh, S., Goswami, P. K., Goud, N. R., Jetti, R. R. K. R., Karpinski, P., Kaushik, P., Kumar, D., Kumar, V., Moulton, B., Mukherjee, A., Mukherjee, G., Myerson, A. S., Puri, V., Ramanan, A., Rajamannar, T., Reddy, C. M., Rodriguez-Horn, N., Rogers, R. D., Row, T. N. G., Sanphui, P., Shan, N., Shete, G., Singh, A., Sun, C. C., Swift, J. A., Thaimattam, R., Thakur, T. S., Thaper, R. K., Thomas, S. P., Tothadi, S., Vangala, V. R., Variankaval, N., Vishweshwar, P., Weyna, D. R., Zaworotko, M. J., Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name?, *Cryst. Growth Des.*, **12**, 2147-2152, 2012.
- 2) Guidance for Industry, ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism, *Food and Drug Administration: Silver Spring*, 2007.
- 3) Grunenberg, A., Henck, J-O., Siensler, H. W., Theoretical derivation and practical application of energy/temperature diagrams as an instrument in preformulation studies of polymorphic drug substances., *Int. J. Pharm.*, **129**, 147-158, 1996.
- 4) Kojima, T., Onoue, S., Katoh, F., Teraoka, R., Matura, Y., Kitagawa, S., Tshako, M., Effect of spectroscopic properties on photostability of tamoxifen citrate polymorphs., *Int. J. Pharm.*, **336**, 346-351, 2007.
- 5) Campos, K. R., Coleman, P. J., Alvarez, J. C., Dreher, S. D., Garbaccio, R. M., Terrett, N. K., Parmee, E. R., The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry., *Science*, **363**, 6424, eaat0805, 2019.
- 6) Zhang, G. G. Z., Henry, R. F., Borchardt, T. B., Lou, X., Efficient co-crystal screening using solution-mediated phase transformation., *J. Pharm. Sci.*, **96**, 990-995, 2007.
- 7) Lee, E. H., A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection., *Asian J. Pharm. Sci.*, **9**, 163-175, 2014.
- 8) Newman, A., Specialized solid form screening techniques., *Org. Process Res. Dev.*, **17**, 457-471, 2013.
- 9) Bauer, J., Spanton, S., Henry, R., Quick, J., Dziki, W., Porter, W., Morris, J., Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism., *Pharm. Res.*, **18**, 859-866, 2001.
- 10) Bučar, D. K., Lancaster, R. W., Bernstein, J., Disappearing Polymorphs Revisited. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 6972-6993, 2015
- 11) Hilfiker, R., Berghausen, J., Blatter, F., Burkhard, A., De Paul, S. M., Freiermuth, B., Geoffroy, A., Hofmeier, U., Marcolli, C., Siebenhaar, B., Szelagiewicz, M., Vit, A., von Raumer, M., Polymorphism-integrated approach from high-throughput screening to crystallization optimization., *J. Therm. Anal. Calorim.*, **73**, 429-440, 2003.

- 12) ICHQ3C(R8). IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENT. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE., 2021.
- 13) Otsuka, M., Onoe, M., Matsuda, Y., Physicochemical stability of phenobarbital polymorphs at various levels of humidity and temperature., *Pharm. Res.*, **10**, 577-582, 1993.
- 14) Raza, K., Kumar, P., Ratan, S., Malik, R., Arora, S., Polymorphism: The phenomenon affecting the performance of drugs., *SOJ Pharm Pharm Sci*, **1**, 10, 2014.
- 15) Hiendrawan, S., Widjojokusumo, E., Veriansyah, B., Tjandrawinata, R. R., Pharmaceutical salts of carvedilol: polymorphism and physicochemical properties., *AAPS Pharmscitech*, **18**, 1417-1425, 2017.
- 16) Narang, A. S., Desai, D., Badawy, S., Impact of excipient interactions on solid dosage form stability., *Excipient applications in formulation design and drug delivery*, Springer, Cham, 93-137, 2015.
- 17) Darji, M. A., Lalge, R. M., Marathe, S. P., Mulay, T. D., Fatima, T., Alshammari, A., Lee, H. K., A Repka, M., Narasimha Murthy, S., Excipient stability in oral solid dosage forms: a review., *AAPS Pharmscitech*, **19**, 12-26, 2018.
- 18) Larsen, P. A., Patience, D. B., Rawlings, J. B., Industrial crystallization process control., *IEEE Control Systems Magazine*, **26**, 70-80, 2006.
- 19) Myerson, A., Handbook of industrial crystallization., *Butterworth-Heinemann*, 2002.
- 20) Mullin, J.W., Crystallization, 4th ed., *Butterworth-Heinemann: Oxford, UK.*, 181-215, 2001.
- 21) 後藤 芳彦, 結晶成長, 内田老鶴圃, 東京, 2003
- 22) Hilfiker, R., Polymorphism: in the pharmaceutical industry., *John Wiley & Sons*, 2006.
- 23) Bennema, P., Van Eupen, J., Van der Wolf, B. M. A., Los, J. H., Meekes, H., Solubility of molecular crystals: Polymorphism in the light of solubility theory., *Int. J. Pharm.*, **351**, 74-91, 2008.
- 24) Mangin, D., Puel, F., Veessler, S., Polymorphism in processes of crystallization in solution: a practical review., *Org. Process Res. Dev.*, **13**, 1241-1253, 2009.
- 25) Ostwald, W., Studien über die Bildung und Umwandlung fester Körper: 1., *Abhandlung: Übersättigung und überkaltung. Zeitschrift für physikalische Chemie*, **22**, 289-330, 1897.
- 26) Higuchi, W. I., Bernardo, P. D., Mehta, S. C., Polymorphism and drug availability II: dissolution rate behavior of the polymorphic forms of sulfathiazole and methylprednisolone., *J. Pharm. Sci.*, **56**, 200-207, 1967.
- 27) Lindenberg, C., Krättli, M., Cornel, J., Mazzotti, M., Brozio, J., Design and optimization of a combined cooling/antisolvent crystallization process., *Cryst. Growth Des.*, **9**, 1124-1136, 2009.

- 28) Nowee, S. M., Abbas, A., Romagnoli, J. A., Antisolvent crystallization: Model identification, experimental validation and dynamic simulation., *Chem. Eng. Sci.*, **63**, 5457-5467, 2008.
- 29) Kolář, P., Shen, J. W., Tsuboi, A., Ishikawa, T., Solvent selection for pharmaceuticals., *Fluid Phase Equilib.*, **194**, 771-782, 2002.
- 30) Machiya, K., Ieda, S., Hirano, M., Ooshima, H., Effects of Impurities on Crystal Polymorphism of an Imidazopyridine Derivative Developed as a Drug Substance for Osteoporosis., *J. Chem. Eng. Jpn.*, **42**, 147-152, 2009.
- 31) Okamoto, M., Hamano, M., Igarashi, K., Ooshima, H., The effects of impurities on crystallization of polymorphs of a drug substance AE1-923., *J. Chem. Eng. Jpn.*, **37**, 1224-1231, 2004.
- 32) Dunitz, J. D., Bernstein, J., Disappearing polymorphs., *Acc. Chem. Res.*, **28**, 193-200, 1995.
- 33) Bučar, D. K., Lancaster, R. W., Bernstein, J., Disappearing polymorphs revisited., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 6972-6993, 2015.
- 34) Henck, J. O., Bernstein, J., Ellern, A., Boese, R., Disappearing and reappearing polymorphs. The benzocaine: picric acid system., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1834-1841, 2001.
- 35) Morissette, S. L., Soukasene, S., Levinson, D., Cima, M. J., Almarsson, Ö., Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization., *PNAS*, **100**, 2180-2184, 2003.
- 36) Barsky, I., Bernstein, J., Stephens, P. W., Stone, K. H., Cheung, E., Hickey, M. B., Henck, J. O., Disappearing and reappearing polymorphism in p-methylchalcone., *Cryst. Growth Des.*, **8**, 63-70, 2008.
- 37) Braun, D. E., Kahlenberg, V., Gelbrich, T., Ludescher, J., Griesser, U. J., Solid state characterisation of four solvates of R-cinacalcet hydrochloride., *CrystEngComm*, **10**, 1617-1625, 2008.
- 38) Mimura, H., Kitamura, S., Kitagawa, T., Kohda, S., Characterization of the non-stoichiometric and isomorphic hydration and solvation in FK041 clathrate., *Colloids Surf., B*, **26**, 397-406, 2002.
- 39) Douillet, J., Stevenson, N., Lee, M., Mallet, F., Ward, R., Aspin, P., Dennehy, D. R., Camus, L., Development of a solvate as an active pharmaceutical ingredient: Developability, crystallisation and isolation challenges., *J. Cryst. Growth*, **342**, 2-8, 2012.
- 40) Tieger, E., Kiss, V., Pokol, G., Finta, Z., Dušek, M., Rohlíček, J., Skořepová, E., Brázda, P., Studies on the crystal structure and arrangement of water in sitagliptin L-tartrate hydrates., *CrystEngComm*, **18**, 3819-3831, 2016.

- 41) Campeta, A. M., Chekal, B. P., Abramov, Y. A., Meenan, P. A., Henson, M. J., Shi, B., Horspool, K. R., Development of a targeted polymorph screening approach for a complex polymorphic and highly solvating API., *J. Pharm. Sci.*, **99**, 3874-3886, 2010.
- 42) Censi, R., Di Martino, P., Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs., *Molecules*, **20**, 18759-18776, 2015.
- 43) Hickey, M. B., Peterson, M. L., Manas, E. S., Alvarez, J., Haeffner, F., Almarsson, Ö., Hydrates and Solid-State Reactivity, A Survey of β -Lactam Antibiotics., *J. Pharm. Sci.*, **96**, 1090-1099, 2007.
- 44) Takeuchi, Y., Takebayashi, Y., Sunagawa, M., Isobe, Y., Hamazume, Y., Uemura, A., Noguchi, T., The stability of a novel carbapenem antibiotic, meropenem (SM-7338), in a solid-state formulation for injection., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1998-2002, 1993.
- 45) Needham, F., Crowder, C. E., Reid, J. W., Fawcett, T. G., Faber, J., X-ray powder diffraction analysis of imipenem monohydrate., *Powder Diffraction.*, **27**, 20-24, 2012.
- 46) Valentina, C., Norberto, M., Giovanni, P., Crystal Chemistry of the Antibiotic Doripenem., *J. Pharm. Sci.*, **103**, 3641-3647, 2014.
- 47) Nangia, A., Biradha, K., Desiraju, G. R., Correlation of biological activity in β -lactam antibiotics with Woodward and Cohen structural parameters: A Cambridge database study., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **5**, 943-953, 1996.
- 48) Takeuchi, Y., Takebayashi, Y., Sunagawa, M., Isobe, Y., Hamazume, Y., Uemura, A., Noguchi, T., The stability of a novel carbapenem antibiotic, meropenem (SM-7338), in a solid-state formulation for injection., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1998-2002, 1993.
- 49) Vangala, V. R., Chow, P. S., Tan, R. B. H., The solvates and salt of antibiotic agent, nitrofurantoin: Structural, thermochemical and desolvation studies., *CrystEngComm*, **15**, 878-889, 2013.
- 50) Kawamoto, I., Shimoji, Y., Kanno, O., Kojima, K., Ishikawa, K., Matsuyama, E., Ashida, Y., Shibayama, T., Fukuoka, T., Ohya, S., Synthesis and structure-activity relationships of novel parenteral carbapenems, CS-023 (R-115685) and related compounds containing an amidine moiety., *J. Antibiot.*, **56**, 565-579, 2003.
- 51) Shibayama, T., Sugiyama, D., Kamiyama, E., Tokui, T., Hirota, T., Ikeda, T., Characterization of CS-023 (RO4908463), a Novel Parenteral Carbapenem Antibiotic, and Meropenem as Substrates., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 41-47, 2007.

第2章 加水分解抑制を目的とした CS-023 の多形制御

2.1 緒言

CS-023 は他のカルバペネム系抗生物質と比べて体内での半減期が長いため、新規のカルバペネム系合成抗菌薬として有望であるが、1.9 項で述べたように β -ラクタムは 4 員環のひずみ構造により加水分解しやすい。そのため原薬形態はアモルファスよりも結晶であることが望ましい。CS-023 は水溶性を高める分子設計がされており、水に溶解しやすく有機溶媒には溶けにくい。そのため、CS-023 の製造では水を含む溶液からの晶析が想定されるが、その過程で分解する恐れがある。したがって、分解を抑制した製造方法の開発が望まれる。

本章では、まず CS-023 の水溶液からの冷却晶析を行い、安定な水和物結晶の所得を試みた。そして、結晶化時の加水分解を抑制する新たな晶析方法について検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 晶析実験

水溶液中における CS-023 の冷却晶析は以下の方法で行った。CS-023 10 g を 50 mL の水に加え、70 °C に加熱して完全に溶解した。溶解後、0.2 μm メンブレンフィルターを用いてろ過した。溶液はマグネチックスターラーを用いて攪拌しながら、溶解確認後、直ちに 25 °C まで冷却した。CS-023 の水への溶解度は、25 °C で 25.9 g/L、70 °C で 280.1 g/L であり、初期過飽和比 S (C/C_s : C は CS-023 の濃度、 C_s は溶解度) は 7.7 である。約 1.5 時間経過後、結晶の析出が始まった。6.5 時間経過後に結晶を 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過し、棚型乾燥機にて 25 °C、圧力 1.2 kPa で乾燥した。

異なる別の結晶化方法として、エタノールを貧溶媒とした貧溶媒晶析を行った。温度は 25 °C 一定で行った。10 g の CS-023 を水 400 mL に溶解し、エタノール 1600 mL を

溶液中に急速に加えた。CS-023 は 25 °C での水に対する溶解度は低いことから、10 g の CS-023 を溶解するためには大量の水が必要である。しかし、CS-023 の 80 v/v% エタノールへの 25 °C の溶解度は、0.277 g/L とさらに低い。したがって、水に CS-023 を溶解し、エタノールを加え 80 v/v% の組成とすることによって、 $S=18.1$ という大きな初期過飽和比を与えることが可能であり、大量の結晶を十分に回収することができる。エタノールを加えると、直ちに結晶が出現したため、15 分後に結晶をろ過し、エタノールで洗浄し、25 °C、6.2 kPa で乾燥した。

2.2.2 核化誘導時間 (t_{ind}) の測定

ある過飽和を与えてから結晶の析出が観測されるまでの時間を核化誘導時間と定義し、濁度計を用いた核化誘導時間を冷却晶析と貧溶媒晶析について決定した。同じ過飽和比となる条件で実験を行い、各過飽和比に対して同じ実験を 3 回繰り返した。核化誘導時間は 3 回の平均値とした。

核化誘導時間を測定するために使用した装置図を Figure 2-1 に示した。ペルチエ素子を用いて溶液の温度を ± 0.1 °C の範囲内で制御し、濁度を連続的に測定することが可能である。2 mL ガラスセルに精密秤量した一定量の CS-023 結晶を入れ、水を加えた。溶液は $\phi 3$ mm 長さ 6 mm の PTFE 製攪拌子を用いて攪拌した。スラリーを 80 °C まで急速に加熱し、90 秒間保持して結晶を溶解した。その後、溶液を 25 °C まで急速に冷却した。加熱と冷却に要する時間は、それぞれ 90 秒と 120 秒であった。貧溶媒晶析では 25 °C でエタノールを添加した。デジタル増幅器 (OPTEx FA) に装着したファイバースコープを用いて、透過した光の強度を電圧として記録した。検出限界はホルマジン標準液を用いて 1 μm 粒子で濃度 0.1 ppm であった。Figure 2-2 は貧溶媒晶析時の光の強度変化を示している。CS-023 水溶液にエタノールを加えると、エタノールからエタノール/水の混合物になることで、エタノールに溶解していた気体 (空気) が放出されるため、一

時的に光強度は急速にゼロに低下する。エタノール中への気体の溶解度は、水の 22 倍 (25 °C) 高い。そのため、貧溶媒晶析時の核化誘導時間は、光の強度が急激に低下してから、光の強度が低下するまでの時間と定義した。光の強度が低下するまでの時間は、電圧を時間で微分した値を参考にした。一方、冷却晶析では、濁度変化は見られないため、核化誘導の開始時は、溶液温度が 25 °C に到達した点とした。CS-023 は 80 °C で溶解されるが、この操作により、CS-023 がある程度分解される可能性がある。しかし、加熱と冷却に要する時間は 210 秒で、また 80 °C で保持した時間は 90 秒であり、CS-023 の分解は無視できるとした。

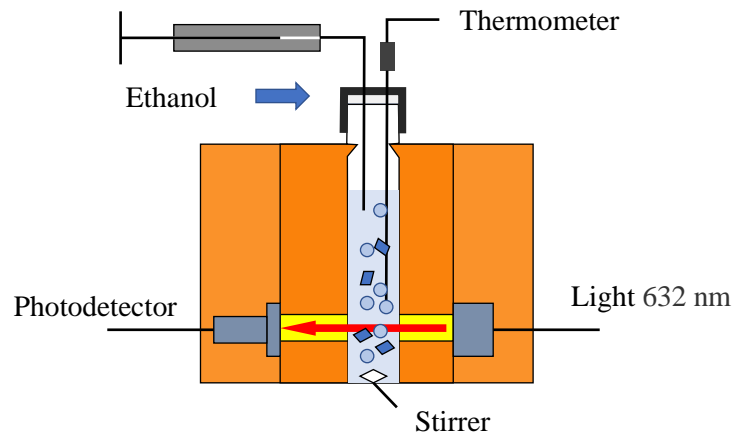


Figure 2-1 Apparatus for measuring the induction time

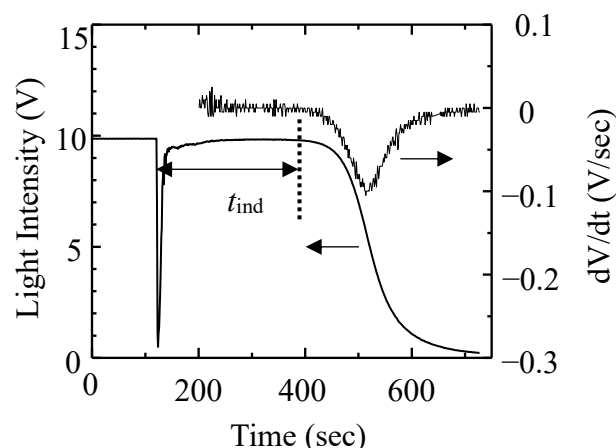


Figure 2-2 Light intensity change to determine induction period (t_{ind}) in the anti-solvent crystallization

2.2.3 CS-023 の溶液および固体の安定性実験

溶液中および固体状態の安定性は以下のように測定した。水溶液中での CS-023 の安定性では、1 g の CS-023 を水 40 mL に溶解し、0.2 μm メンブレンフィルターを用いてろ過した。この液を 2 mL ずつ試験管に分注し、マグネチックスターラーで攪拌しながら所定温度の水浴中でインキュベートした。一定間隔で 20 μL をサンプリングし、HPLC を用いて CS-023 の濃度を分析した。

固体状態の CS-023 の安定性試験は、粒子径の影響を避けるために結晶の粒子径を揃えて実施した。粒子径を揃えるため、湿式ジェットミル Nano Jet Pal JN 20 (JOKOH) でスラリーを粉砕し、ろ過後、乾燥したものを試験体とした。乾燥については、溶媒和物結晶の種類により、2.2.1 項に記載した方法を採用した。粉砕された粒子のサイズは、レーザー回折/散乱分析装置 LA 960 (堀場製作所) を用いて測定した。平均粒子径 6.2 μm の粒子を用いて、固体状態の CS-023 の安定性を測定した。固体 1 g を蓋のないガラス容器に入れ、湿度調整可能な恒温室中に 40 $^{\circ}\text{C}$ で静置した。その後、固体試料を経時的に 50 mg サンプリングし、水 50 mL に溶かし、HPLC を用いて CS-023 の濃度を分析した。

2.2.4 熱分析

結晶に含まれる溶媒量は、以下の装置を用いて測定した。EXSTAR TG/DTA7200 (日立ハイテクノロジーズ) を用いて熱重量天秤 (TG) による熱分析を行った。試料 (20 ~ 30 mg) を開放型のアルミ製パンに置き、100 mL/min の窒素環境下で 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で 25 $^{\circ}\text{C}$ から 180 $^{\circ}\text{C}$ まで加熱し、重量減少を測定した。

熱重量天秤の分析中に重量減少した物質を別の試験法を用いて同定した。CS-023 の各多形の試料を棚式乾燥機に静置して、5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で加熱し、100、120、150 $^{\circ}\text{C}$ に到達後サンプリングした。得られた固体を、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノンに溶解

させて、ヘッドスペースサンプラーG1880 (Agilent Technologies) を備えたガスクロマトグラフ (GC) 6890N (Agilent Technologies) を用いて成分を決定した。水については、GC で検出されないため、カールフィッシャー水分計 MKA-610 (京都電子) を用いて測定した。

2.2.5 結晶多形の分析

結晶多形の分析は、粉末 X 線回折 (XRD) 装置を用いて行った。温度と湿度を調節可能なステージを備える Bruker D8 Advance (Bruker AXS) を用い、40 kV、40 mA で CuK α 放射線 (1.5418 Å) を用いて測定した。回折パターンは、回折角 2θ が 2° から 42° の間で、分解能 0.02 °ステップで記録した。ドーム型ホットステージ DHS900 (Anton Paar) を取り付けて窒素環境下で温度を変えた測定を行った。湿度コントロールは SRG-1R (神栄) を用いて、25 °C で湿度を変えた XRD 測定を行った。

2.2.6 加熱ステージ偏光顕微鏡による観察

加熱中または冷却中の結晶の多形観察と湿度環境変化に伴う結晶の多形観察は、以下の装置を用いて行った。湿度調整可能な加熱ステージを備えた偏光顕微鏡として、BX51 (オリンパス) を用い、加熱ステージは 10002L (Linkam) を用いた。試料観察はクロスニコルで、1/4 波長板を重ねて行った。窒素環境下で 25 °C から 180 °C まで、10 °C/min の速度で加熱し、180 °C に到達後、10 °C/min の速度で 25 °C まで冷却した。その後、湿度は SRG-1R (神栄) を用いて制御した。

2.2.7 水およびエタノールの吸着等温線の測定

得られた結晶の水とエタノールの吸着等温線は、DVS Advantage-1 (Surface Measurement Systems) を使用して、相対湿度 0 %RH から 95 %RH の範囲を 5% 間隔で測

定した。それぞれの湿度において、重量変化が 5 分間で 0.001%未満となったとき平衡であると判断した。

2.3 結果と考察

2.3.1 冷却晶析により得られた多形とその固相転移挙動

医薬品原薬の結晶には有機溶媒が含まれていないことが重要である。そのため、水溶液からの冷却晶析を最初に試みた。Figure 2-3 に冷却晶析により得られた CS-023 結晶を示す。約 80%の結晶が凝集し、大きさは約 30 μm であった。Figure 2-4 は、冷却晶析によって得られた結晶の TG 測定の結果を示している。冷却晶析で得られた結晶の TG 測定では、13.0%の重量減少を示した。カールフィッシャー水分計で得られた水分量に一致しており、CS-023 1 分子あたり 4.3 分子相当であることがわかった。

この結果から、結晶が 4 水和物であることが示唆され、この結晶を Form H (CS-023 \cdot 4H₂O) と命名した。Figure 2-5 中段に Form H の回折パターンを示した。水が脱離した固体の特性を調べるために、Form H を窒素環境下で 120 $^{\circ}\text{C}$ まで加熱した後、冷却し XRD 測定を行った。その固体は、Figure 2-5 上段に示す結晶性の回折パターンとなり、その多形を Form H-1 (CS-023 \cdot 無水物) と名付けた。TG 測定では、50 $^{\circ}\text{C}$ から重量減少を始めていることから、相対湿度に応じた水の脱離も予想される。そこで、吸着等温線を測定すると共に、様々な湿度環境下で XRD 測定を行った。

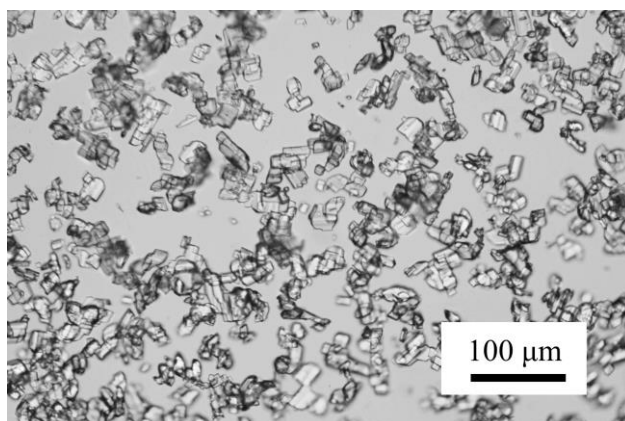


Figure 2-3 Optical micrograph of crystals obtained by cooling crystallization from the aqueous solution

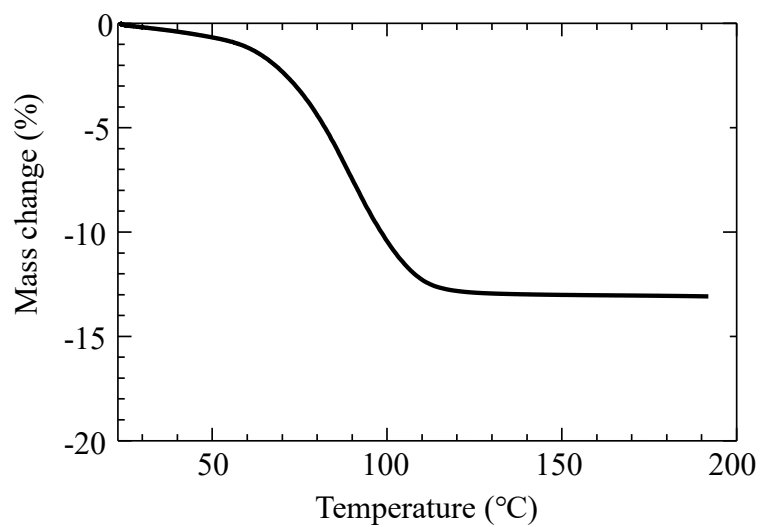


Figure 2-4 Thermogravimetric (TG) diagrams of crystals obtained from an aqueous solution

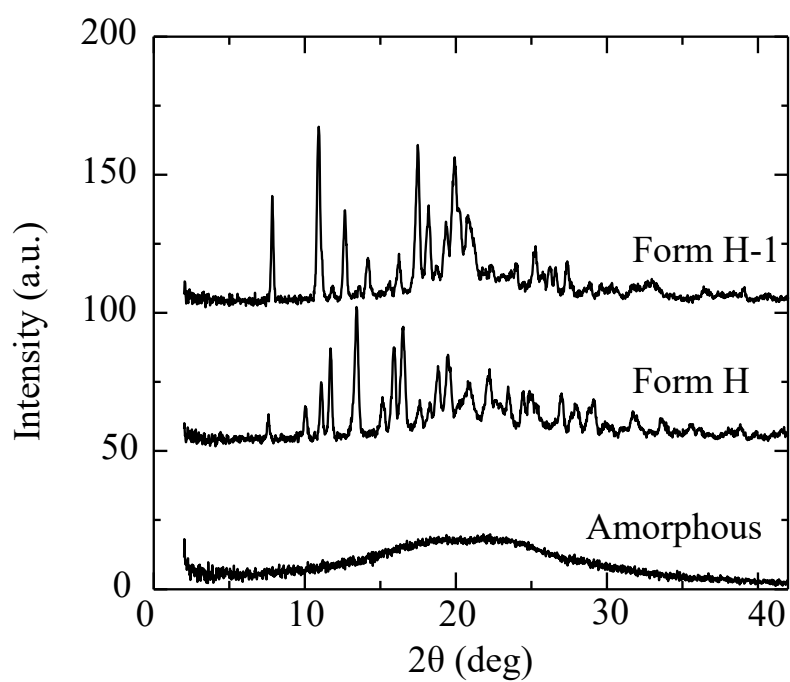


Figure 2-5 The XRD patterns of amorphous CS-023 and two types of polymorphs

まず、Form H を 25 °C の 90 %RH 環境に置き、その湿度から徐々に湿度を下げて 0 %RH とし、再び徐々に 90 %RH 環境にした際の重量変化である吸着等温線を Figure 2-6 に示した。実線と破線は相対湿度に対するそれぞれと脱離と吸収を表している。Form H を湿度に対する水の脱離は 2 段階で起こることが分かった。90 %RH から 20 %RH では、緩やかに 1.0 等量未満の水の減少し、20 %RH から 0 %RH で、13.3 wt% の水が脱離した。13.3 wt% は 4 等量の水分子に相当する。次に、0 %RH から相対湿度を上げていくと 2 段階の水の吸収が見られた。40 %RH では、3.8 等量の水分子に相当する 12.8 wt% の水を吸収し、その後、90 %RH まで相対湿度に応じて約 1.0 等量の緩やかな水の吸収がみられた。

次に、水の吸脱着挙動で結晶構造変化が生じているのかを確認するため、様々な相対湿度における XRD を測定した。Form H を 25 °C の 80 %RH 環境に置き、その湿度から徐々に湿度を下げて 0 %RH とし、再び徐々に 80 %RH まで湿度を上げたときの XRD 回折パターン Figure 2-7 に示した。湿度を下げていく過程の 80 %RH と 30 %RH の結晶の回折パターンは同じであり、Form H であった。従って、Figure 2-6 の脱離過程で示された 30 %RH までの水分量の変化は、Form H の構造変化に影響を与えていない。さらに湿度を下げて 0 %RH とすると Form H-1 に転移していた。したがって 20 %RH から 0 %RH までの重量減少は Form H から Form H-1 への転移を示していたと考えられる。そして、相対湿度を徐々に上げていくと、30 %RH までは Form H-1 であったが、50 %RH と 80 %RH では Form H に転移していた。よって、水の吸着等温線と XRD 測定結果から Form H は 4 水和物であり、それより過剰な水の吸収は、吸着水であると考えられる。

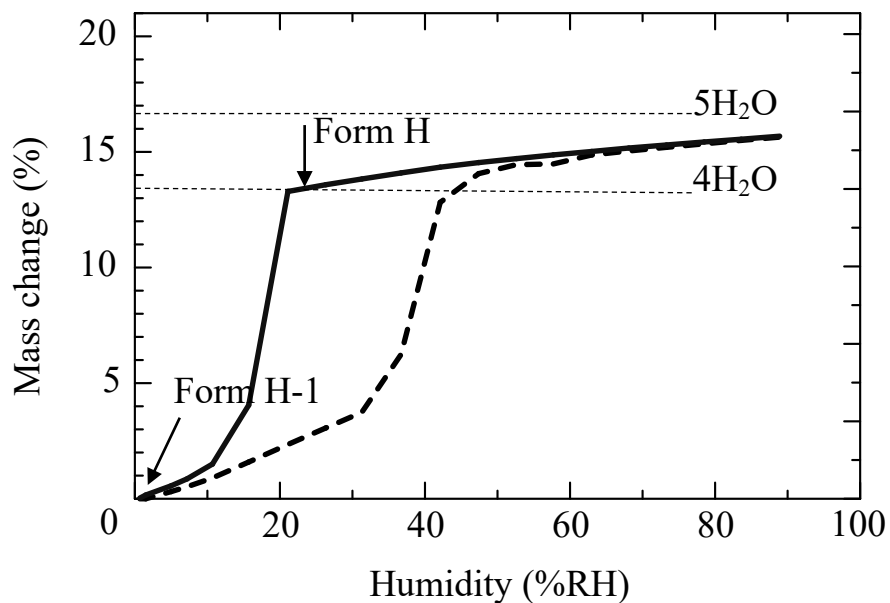


Figure 2-6 Desorption isotherm of water for Form H (solid curve) and absorption isotherm of water for Form H-1 (dotted curve)

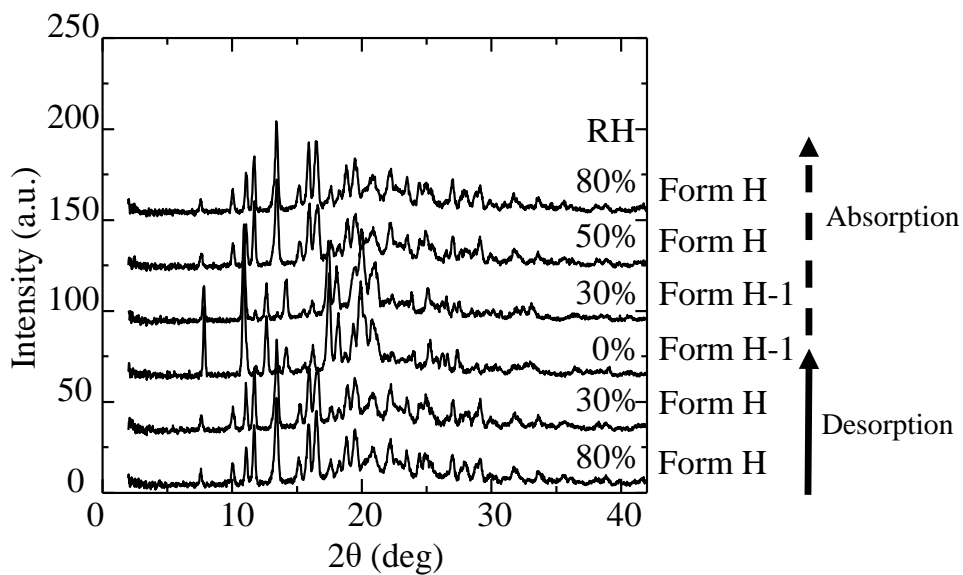


Figure 2-7 Reversible transition between Form H and Form H-1 shown in XRD patterns.

XRD patterns: (the bottom) the original Form H, (the third from the bottom) Form H-1 at 0 %RH, and (the top) the restored Form H

次に、加熱冷却および湿度調整による Form H および H-1 の可逆的な変化を加熱ステージ付きの偏光顕微鏡にて観察した。Figure 2-8(a)は 25 °C、50 %RH での Form H の顕微鏡写真である。窒素雰囲気下で 170 °C に加熱すると Form H-1 が得られるが、Figure 2-8(b)に示した白色サークルで示された結晶のように結晶内部にひびが入った。その後、窒素雰囲気下で 25 °C に冷却したが、偏光色は青色のまま変わらなかった。すなわち、冷却しても変化がなかった。相対湿度を 80 %RH とすると Figure 2-8(c)に示した Form H が得られ、偏光色は青から元と同様の黄色に戻った。Form H と Form H-1 の転移は可逆的であることが再確認された。形状が変化していないことから、固相転移であることがわかった。次に、Figure 2-8(c)の状態から温度を上げずに 0 %RH としたところ Figure 2-8(b)と同じ状態が観察された。さらに、湿度を 80 %RH とすると、Figure 2-8(c)と同じ状態が観察された。偏光顕微鏡の観察においても、Form H-1 と Form H の間の固相転移が湿度に応じて可逆的であることが確認できた。

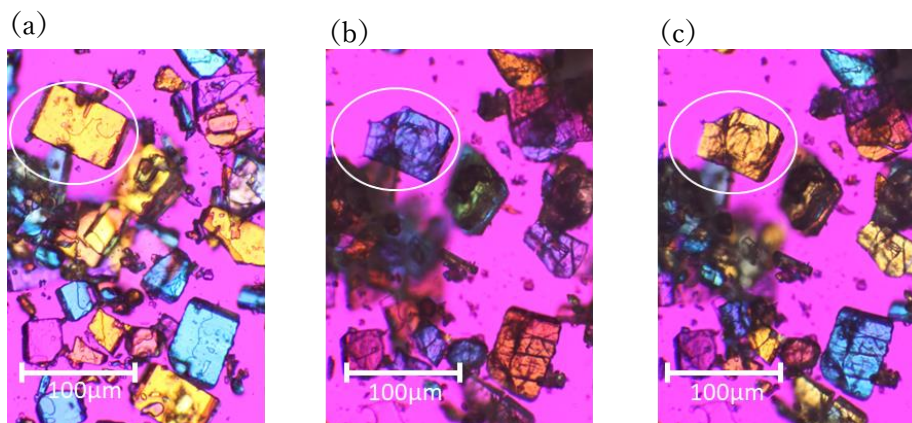


Figure 2-8 The polarized microphotographs: (a) Form H, (b) 0 %RH at 170 °C, (c) 80 %RH at 25 °C after (b)

2.3.2 水溶液及び医薬品原薬の多形としての Form H の CS-023 の安定性

医薬品原薬は、加水分解、酸化および光分解に対して安定でなければ、医薬品原薬として用いることができない¹⁾。そのため、通常、結晶かアモルファスの形態が選択される。また、製造中で使用する溶媒中で、安定でなければ製造が困難になる。そのため、CS-023の水溶液中での安定性と、アモルファス及びForm Hの湿度調整した大気中での安定性を調べた。

まず、水溶液中におけるCS-023の濃度の経時変化を測定した。初濃度を変えたときのCS-023の濃度の経時変化をFigure 2-9(a)に示した。CS-023が分解してできる生成物は加水分解物であり、そのため、反応速度はCS-023と水の濃度に依存すると考えられる。しかし、晶析に使用する水の量はCS-023の量に比べて非常に多い。したがって、水の濃度は無視でき、CS-023の分解速度は、式(2-1)で表される一次反応で表現できると仮定した。

$$\frac{dc}{dt} = -k_d C \quad (2-1)$$

$$\ln \frac{c}{c_0} = -kt \quad (2-2)$$

ここで、 C はCS-023の濃度、 C_0 は初濃度、 k_d は速度定数である。積分形の数式は、式(2-2)のように表される。Figure 2-9(b)からCS-023の分解速度が初濃度に依存していないことがわかる。そのためCS-023の分解は、式(2-1)に示す一次反応で表せることを示唆している。それぞれの直線の傾きから25℃の水中における分解速度定数 k_d は $8.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ であることがわかった。

温度を変えた測定結果をFigure 2-9(c)に示した。それぞれの温度での速度定数が算出されたため、アレニウスプロットを行った。その結果をFigure 2-10に示す。この図から、活性化エネルギーと頻度因子はそれぞれ $E_a = 64.5 \text{ kJ/mol}$ 、 $A = 21.2 \text{ h}^{-1}$ と求められた。これらから、分解の半減期 $\tau_{1/2}$ が25℃では80.6h、70℃では2.97hと計算された。

核化誘導時間測定時の溶解過程では、80 °Cで 90 秒間等温保持していたが、分解量は 0.6 %と算出され、ほぼ無視して考えてよいということがわかった。一方、工業的な晶析操作において、溶解するために加熱し、ろ過の工程を挟んで冷却晶析を行う場合、約 3 h かかることが想定され、濃度が半分になることがわかった。CS-023 は水溶液中で不安定であり、このような高温の晶析中には、CS-023 は著しく分解する可能性があった。

次に、CS-023 のアモルファス及び結晶の安定性を測定した。Hickey らは、一定の湿度下での β -ラクタム系結晶の加水分解は、ほとんどが結晶の表面で起こることを見出した²⁾。そのため、固体の安定性は粒子の表面積（すなわち粒径）に依存する可能性があると考えられる。そこで、湿式ジェットミルにて水溶液中で粉碎し、粒子径（メジアン径）が $6.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ となった結晶をろ過・乾燥してサンプルとした。アモルファスと Form H について、40 °Cで 0 %RH 及び 75 %RH における安定性を Figure 2-11 に示した。0 %RH 環境下では、Form H は Form H-1 に転移している。Form H-1 は、0 %RH の環境下では長期間安定であったが、アモルファスは 0 %RH 環境下でも分解した。HPLC 分析から主な分解物は Figure 2-12 に示した CS-023 の(a)加水分解体と(b)二量体であった。0 %RH でもアモルファスの加水分解体が見られたことは、結晶と同程度の乾燥条件では水の除去が不十分で、強固に吸着した水が残存していたことが原因と考えられる。75 %RH においては、アモルファスは速やかに分解され、50 日でほぼすべてが分解した。主な分解物は加水分解体が 90%、2 量体が 10%であった。一方、Form H は、100 日で 90%残存し、医薬品形態の多形になりえると考えられた。

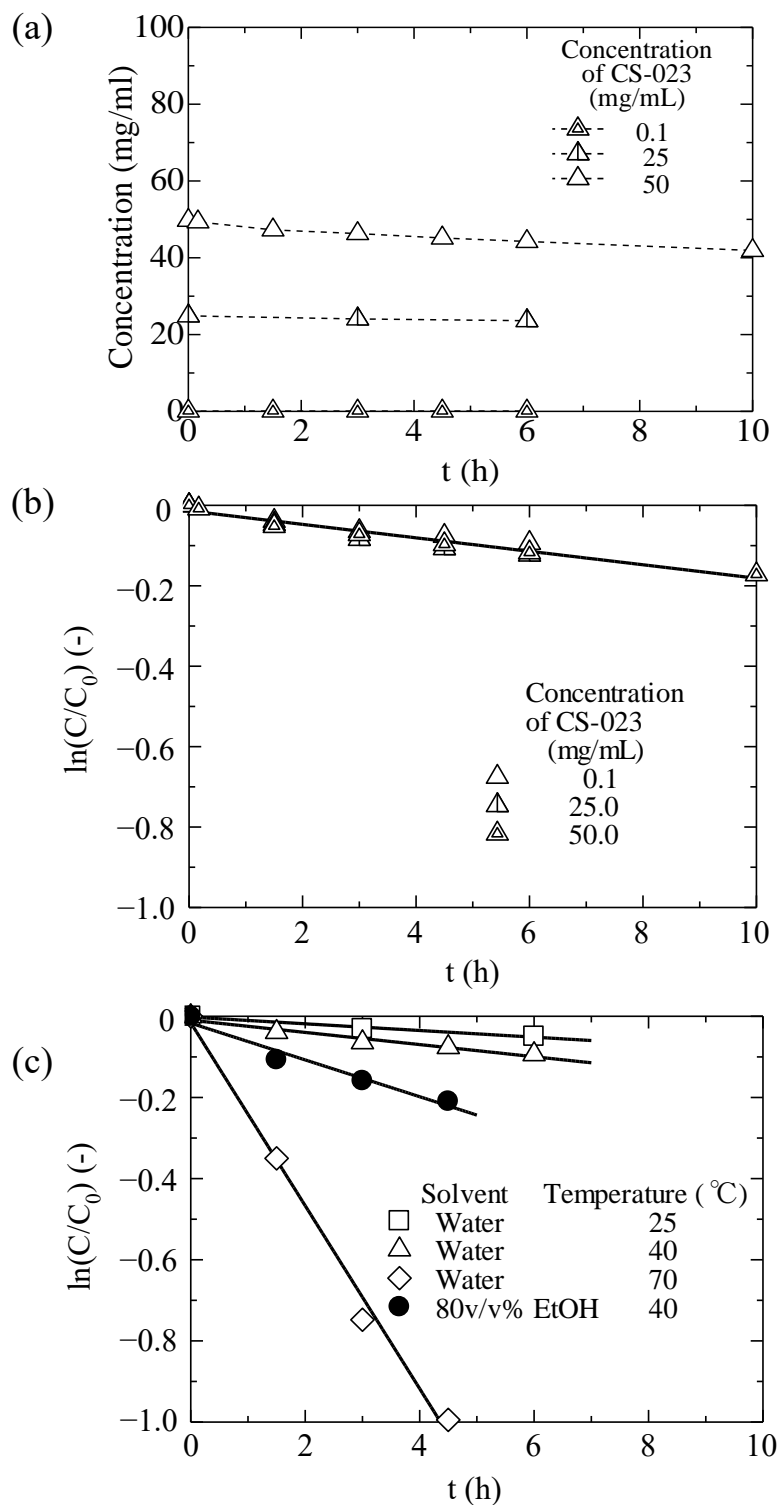


Figure 2-9 Stability of CS-023 in aqueous solution and 80 v/v% ethanol solution: (a) concentration profile at 40 °C, (b) dependence on initial concentration of CS-023 at 40 °C, (c) dependence on temperature

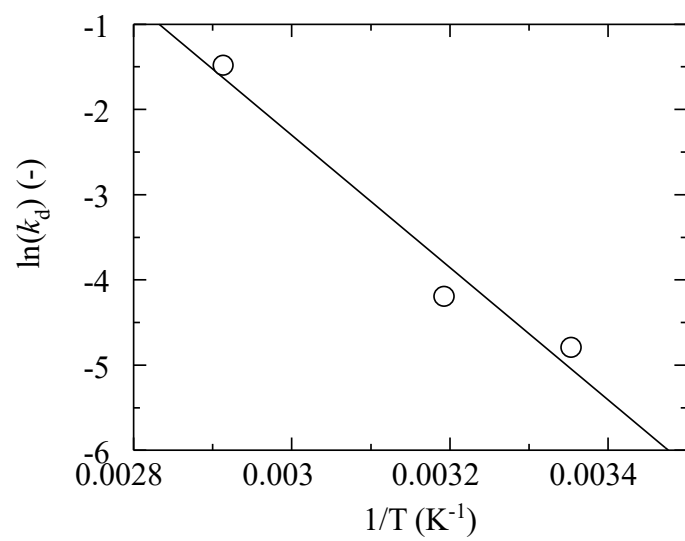


Figure 2-10 The Arrhenius plot of the decomposition rate of CS-023 in an aqueous solution

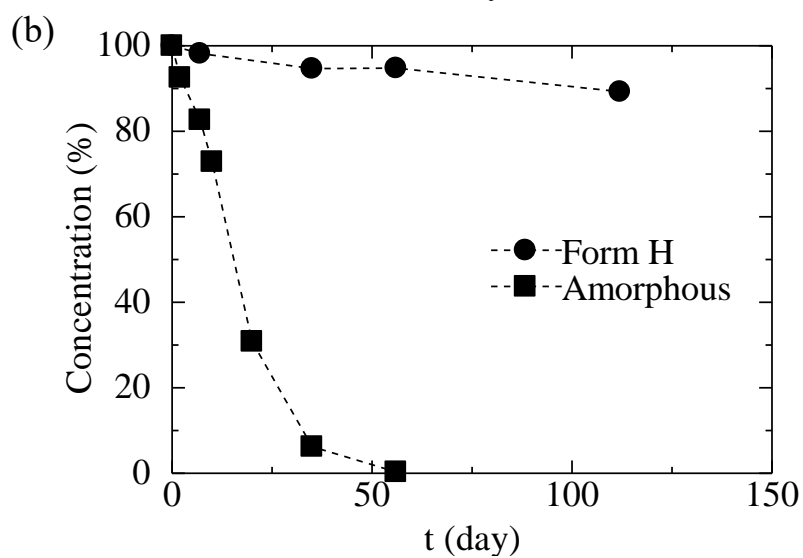
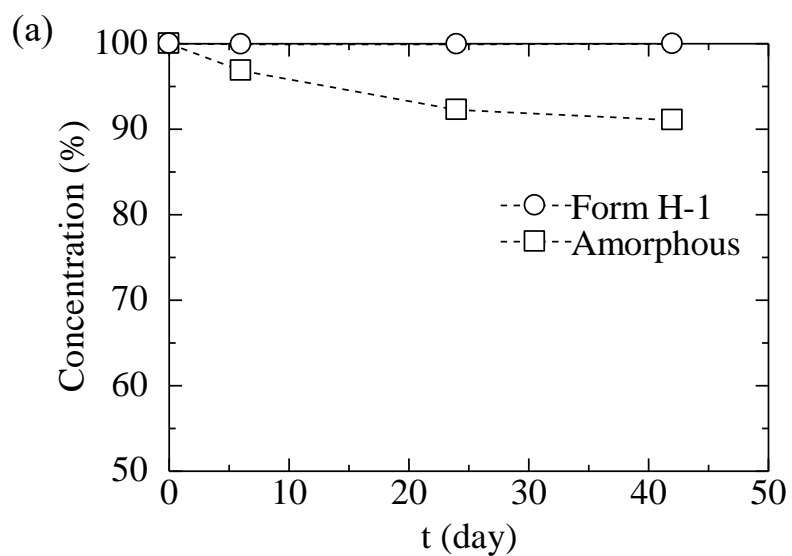


Figure 2-11 Stability of solid CS-023 at 40 °C under humidity at 0 %RH (a), 75 %RH (b)

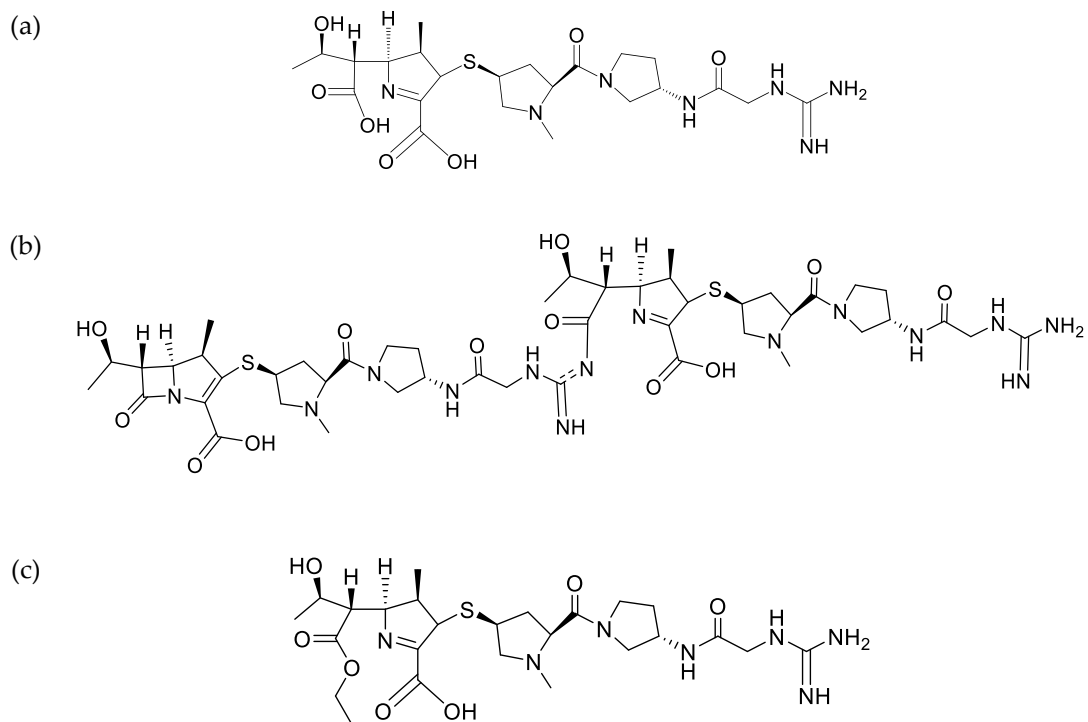


Figure 2-12 Chemical structure of the decomposition product of amorphous CS-023: (a) β -lactam hydrolyzate, (b) dimer, (c) ring-open alcoholysis product

2.3.3 貧溶媒晶析で得られる多形

Form Hは加水分解に対してアモルファスより安定であったが、水に溶解した CS-023 分子は高温条件では不安定であった。冷却晶析では、高温で CS-023 を溶解する工程が含まれるため、その過程で分解してしまう恐れがある。そこで、Form H を収率よく回収するために、別の結晶化プロセスとして貧溶媒晶析を検討した。貧溶媒晶析は、加熱することなく、短時間で結晶を得ることができると期待されるからである。

25 °Cの水溶液に 80 v/v%エタノール水溶液となるようにエタノールを添加して得られた結晶の回折パターンを Figure 2-13(a)に示す。比較として、Form H、H-1 を記載した。Form H、H-1 と回折パターンが異なる結晶が得られたため、この結晶を Form A と命名した。40 °Cにおける水溶液中と 80 v/v%エタノール中での CS-023 の分解速度はエタノール中の分解が水中の分解よりも速い (Figure 2-9(c))。活性化エネルギーがエタノール水溶液中でも水と同じであると仮定すると、80%エタノール水溶液の速度定数

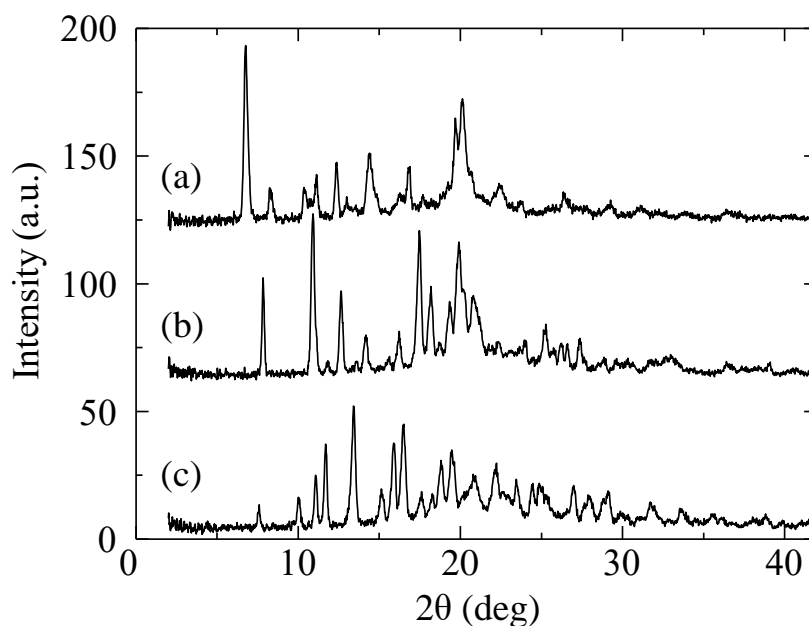


Figure 2-13 The XRD patterns: (a) Form A, (b)Form H-1, (c)Form H

k_d は、25 °Cで $2.8 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ であり、80 v/v%エタノール水溶液中のCS-023は、25 °Cの水よりも27倍不安定である。分解物の92%となる主な分解物はCS-023の β -ラクタム部位のアルコール分解物であり (Figure 2-12(c))、その他の7.3%は加水分解物であった。そのため、CS-023分子の80 v/v%エタノール水溶液を用いた晶析は、CS-023の安定性の観点から難しい可能性がある。一方、一般的に貧溶媒晶析時の誘導時間は過飽和が高くなることで、短くなることが知られている。よって、短時間で晶析が完了するのであれば、CS-023分子の分解は、問題にならない可能性がある。2.2.1で述べたように、貧溶媒晶析における初期過飽和比は18.1と大きくすることができる。結晶化はわずか15分の短い時間内に完了した。そのため、分解に関しては問題にならなかった。

Figure 2-14に飽和比を変えた冷却晶析と貧溶媒晶析による核化誘導時間の測定結果を示した。冷却晶析よりも貧溶媒晶析の核化誘導時間が短いことがわかった。従って、貧溶媒晶析では核形成速度が速く、多くの小さな結晶の生成が期待される。しかし、実際には冷却晶析よりも大きなサイズの結晶が得られた。Figure 2-15は、貧溶媒晶析によって得られた結晶の光学顕微鏡写真である。結晶のサイズは核形成および成長速

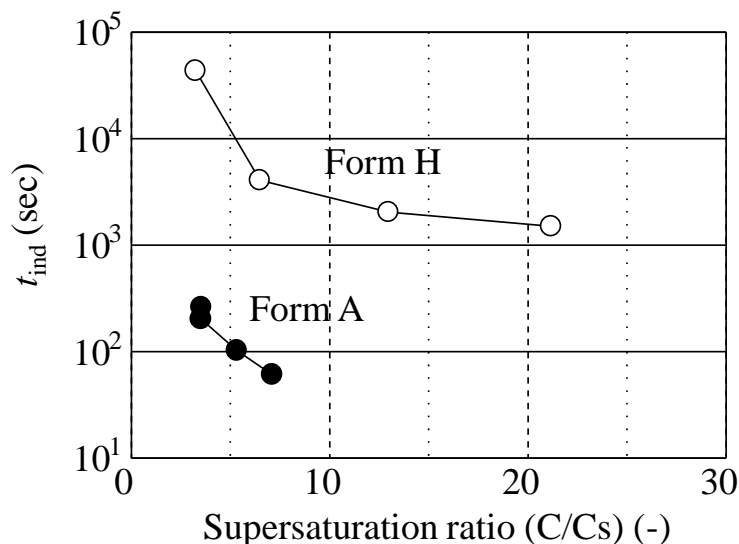


Figure 2-14 Induction period, t_{ind} , in cooling and anti-solvent crystallization at 25 °C

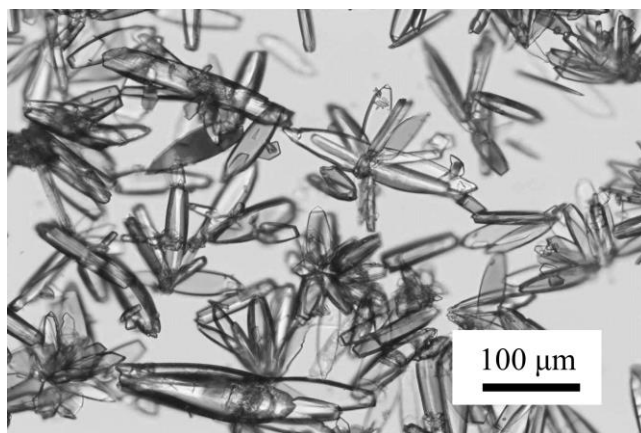


Figure 2-15 Micrograph of Form A obtained by anti-solvent crystallization

度と関係している。冷却晶析および貧溶媒晶析で回収された結晶の収率（CS-023 の収量/理論収率）はほとんど同一で、それぞれ 85%（Gross 8.71 g Net 7.46 g）と 86%（Gross 9.45 g Net 8.92 g）であった。核形成速度が速い場合、結晶個数は増加するため、得られる結晶のサイズは小さくなる。逆に、核形成速度が遅い場合は、結晶個数が少なくなる。

貧溶媒晶析では高い過飽和度を与えることができるため、一般的に、核形成速度が速く、粒子径が小さくなることが予想された。しかし、Figure 2-15 に示したように冷却晶析で得られた Form H より大きな結晶が得られた。核化誘導時間測定から結晶核が最初に現れる時間は早いものの、核形成の速度は遅く、速い結晶成長が生じており、その理由を説明する必要がある。

古典的均一核形成理論では、核形成速度は式(1-3)で表されることを述べた。そして、 J の逆数は核が形成する平均的な時間の間隔として表されることになるため、一般的に核化誘導時間は式(2-3)で表わされる。

$$\tau = \frac{1}{J} = \frac{1}{nN_0v} \quad (2-3)$$

古典的均一核形成理論は、核形成のイベントを単純に表現するために提案されてき

たものであり、理想的な定常状態条件で、一旦過飽和が達成されると瞬時に一次核形成が生じると予測される³⁾。

貧溶媒晶析においても、古典的核形成理論に従うならば、表面張力や濃度に従い確率論的に核形成が生じるため固有の速度定数に従うことになる。この理論では、溶質と溶媒の種類や組成との相互作用の影響は考慮されていない。析出する多形と溶媒の種類、不純物の影響によって、長い誘導時間を経て結晶化が観測されることが報告されている^{4,5,6)}。丸山らはタルチレリンの晶析において、溶解度が大きく変わらない水とメタノール組成の範囲に関わらず、水と 10 v/v%未満のメタノールを含む水溶液中では準安定な多形が結晶化するのに対し、30 v/v%を超えるメタノール水溶液では安定な多形が結晶化すると報告した⁷⁾。この核形成時に速度差が現れる理由として、溶媒組成によって、溶液中の分子のコンフォメーションが変化し、核形成の速度を支配するのは溶液構造であると指摘した。これ以外にも、BPT の晶析において、溶媒組成によって多形の出現率が変ることが報告されている⁸⁾。核形成の議論において溶媒分子と溶質分子の相互作用が示されることなく、これらの現象を説明することは難しい。

Xing は、同じ過飽和溶液を用いて冷却と加熱を繰り返し、晶析析出までの誘導時間を測定したところ、繰り返し数が多くなるほど誘導時間が短くなったことを報告している⁹⁾。このことは、核形成の際に生じる溶液構造の形成とともに説明されている。

これらのことから、貧溶媒晶析の核形成速度が遅いことは、次のように説明できると考えた。溶液構造の観点から、CS-023 水溶液にエタノールを速やかに添加した場合、水中で形成される CS-023 分子のコンフォメーションや分子会合体のコンフォメーションが、80 v/v%エタノール中では再構築しなければならないが、速やかに変化しない可能性がある。その結果、最初の核化誘導時間は早いものの、新しい結晶の核形成が遅れ、大きな結晶の形成を引き起こしたと考えられる。

次に、80 v/v%エタノール水溶液の晶析で得られた結晶の TG 測定結果を Figure 2-16

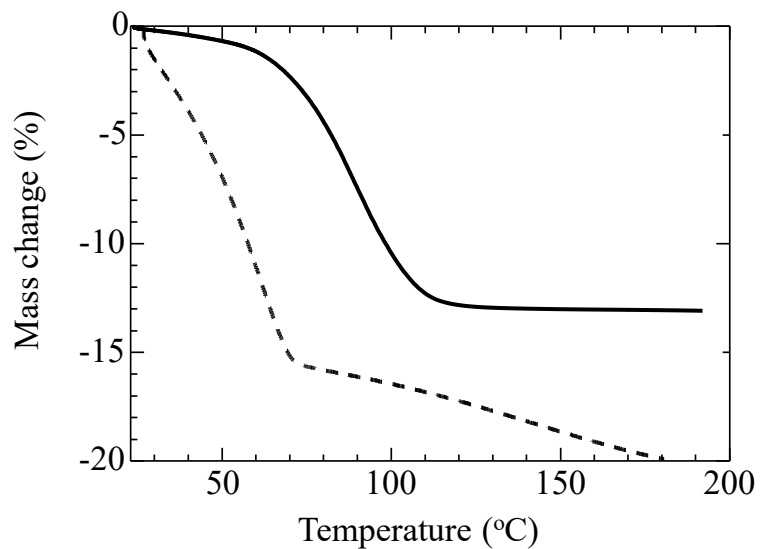


Figure 2-16: Thermogravimetric (TG) diagrams of Form H (solid curve) and crystals obtained from an 80% ethanol solution (dotted curve)

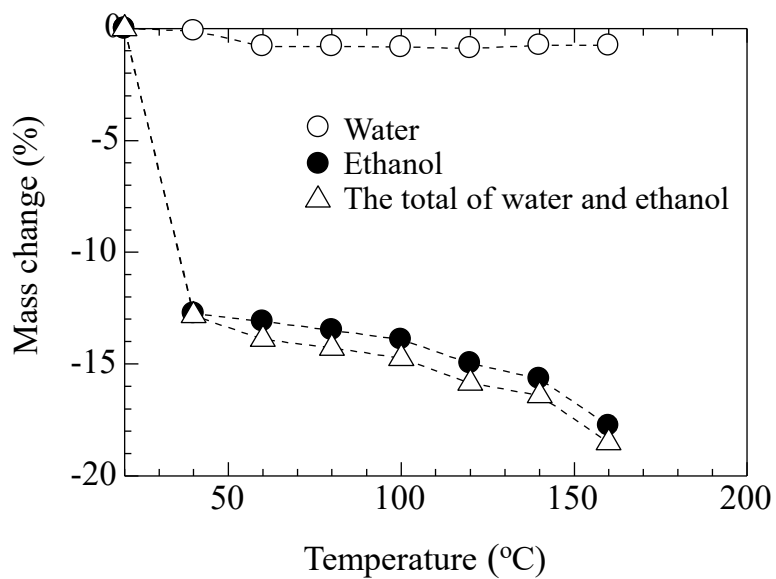


Figure 2-17 Measurement of water and ethanol content during temperature elevation using a shelf-type dryer

の破線の曲線で示した。参考として、Form H の TG 測定結果を実線で示している。また、Figure 2-17 に棚乾燥機で昇温しながら乾燥し、様々な温度でサンプリングし、カールフィッシャー水分計とガスクロマトグラフにより水とエタノールを測定した結果を示した。これらの結果から、Form A は CS-023 1 分子あたり 2.5 分子のエタノールと 0.5 分子の水を含む溶媒和結晶であり、すなわち、CS-023 \cdot 5/2 エタノール \cdot 1/2H₂O 和物 (CS-023 \cdot 5/2EtOH \cdot 1/2H₂O) と同定された。

2.3.4 Form A からの Form H への固相転移

冷却晶析で得た Form H は比較的安定であった。しかし、収率よく回収しようとする と溶解過程で高い温度にする必要があり、実験室では問題ないが工業的製造スケールでは急速な加熱と冷却が困難なため、溶液中で分解する懸念がある。一方で、貧溶媒 晶析では Form A が得られるが、医薬品として好ましくないエタノールを含む。Form A は核形成が遅いが、結晶成長が速いため、分解なく回収することができる。そこで、Form A を起点として、Form H を取得する方法を考えた。Form A から Form H を得るプロセスとしては、溶媒媒介転移と固相転移が考えられる。溶媒媒介転移では、Form A は水溶液に長時間懸濁しなければならない可能性があり、分解する恐れがある。そのため、固相転移を試みた。固相転移によりエタノールを脱離する方法としては、加熱する、減圧乾燥する、水蒸気環境にする、などが考えられる。

まず、減圧乾燥することを考えた。減圧乾燥する際には、溶媒の分圧により、どのような多形変化を示すのかを知ることが重要である。そのため、Form A の脱離と吸収について、エタノールの相対蒸気圧に対する重量変化を測定した。 P_E をエタノールの蒸気圧、 P_{E0} をエタノール飽和蒸気圧とすると、エタノールの相対蒸気圧の割合は、 $\%P_E/P_{E0}$ で表される。貧溶媒晶析にて Form A を回収した後、吸着等温線測定装置に静置し、90 $\%P_E/P_{E0}$ の環境で重量変化がなくなるまで乾燥した。その後、90 $\%P_E/P_{E0}$

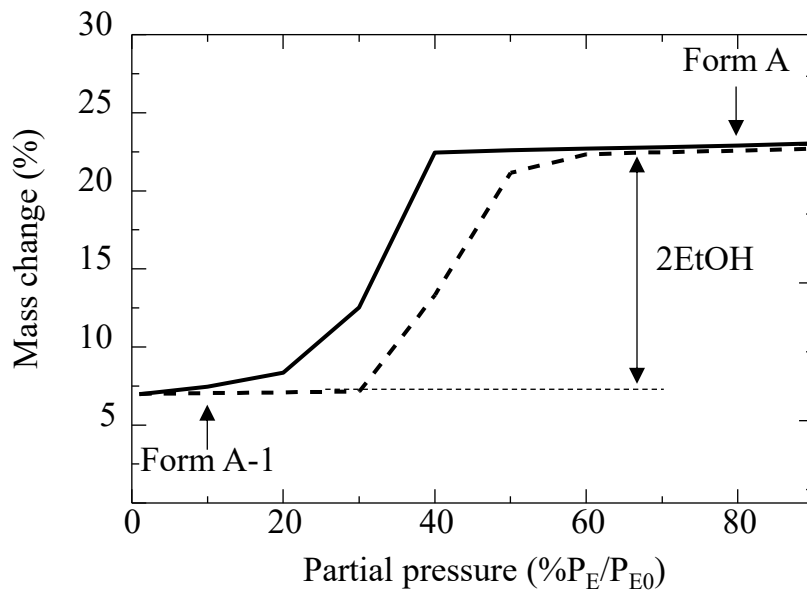


Figure 2-18 Desorption isotherm of ethanol for Form A (solid curve) and absorption isotherm of ethanol for Form A-1 (dotted curve)

から $0\%P_E/P_{E0}$ へ徐々にエタノール蒸気圧を下げた。脱離の重量変化を Figure 2-18 の実線で示した。次に、 $0\%P_E/P_{E0}$ になった後、再び $90\%P_E/P_{E0}$ に分圧を上げた。吸収の重量変化を Figure 2-18 の破線で示した。 $90\%P_E/P_{E0}$ から $40\%P_E/P_{E0}$ までの相対蒸気圧の間、2.5 等量のエタノールの重量は変化がなく、 $20\%P_E/P_{E0}$ にかけて 2.0 等量のエタノールが脱離した。その後、 $0\%P_E/P_{E0}$ まで重量変化がなかった。次に、 $0\%P_E/P_{E0}$ から相対蒸気圧を高くした。 $0\%P_E/P_{E0}$ から $30\%P_E/P_{E0}$ の間は重量変化がなく、 $30\%P_E/P_{E0}$ から $50\%P_E/P_{E0}$ の間で 2.0 等量のエタノールが吸収された。

2.0 等量のエタノールが脱離した多形を調べるために、XRD 測定を行った。その回折パターンを Figure 2-19(b) に示した。Form A (Figure 2-19(a)) と異なる回折パターンを示しており、新たな多形として Form A-1 と命名した。Form A-1 は $50\%P_E/P_{E0}$ 以上で Form A と同じ回折パターンに戻ることを確認した。そして、Form A-1 中の水分とエタノールを測定した。水分とエタノールは、それぞれ 1.42 wt%、4.42 wt% 含まれていることがわかり、それぞれ 0.52 等量、0.54 等量に相当した。そのため、CS-023・1/2 エタ

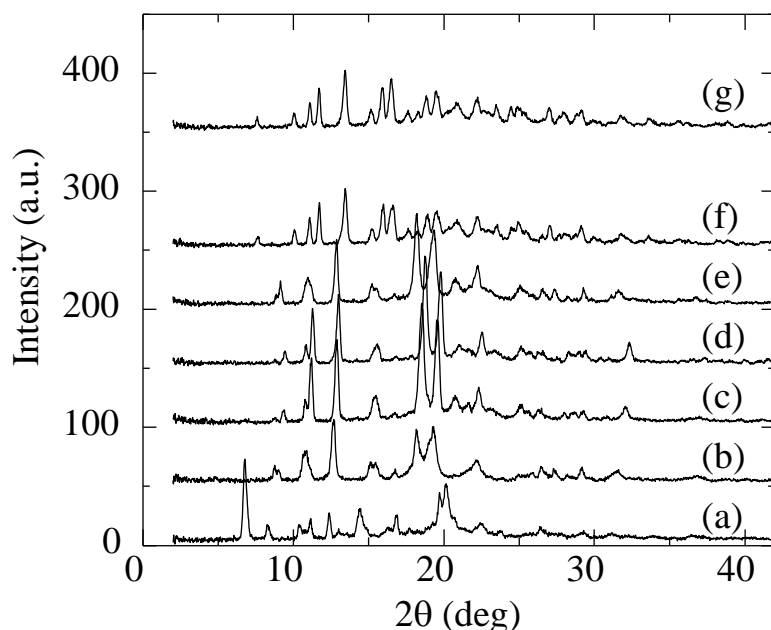


Figure 2-19 X-ray diffraction (XRD) patterns of polymorphs appearing during the transition of Form A to Form H: (a) Form A, at the start of standing in an 80% EtOH partial pressure environment, (b) Form A-1, standing at a partial pressure of 0% RH, (c) Form A-2, at 170 °C, (d) Form A-2, at 25 °C, (e) Form B, standing at 70% RH, (f) Form H, standing at 90% RH, (g) Form H, as a reference

ノール・1/2 水和物 ($\text{CS-023} \cdot 1/2\text{EtOH} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) と同定した。その後、窒素により Form A-1 の乾燥を続けたが、変化が見られなかった。

次に、熱分析から重量減少していることがわかったため、加熱することによってエタノールを脱離させる方法を考えた。そして、加熱時の変化を回折パターンで詳細を確認した。Form A を 170 °C に加熱すると、Figure 2-16、2-17 から結晶中のエタノールと水がすべて脱離していた。つまり、Form A は、Form A-1 を経由して、溶媒を含まない異なる多形に転移していたと考えられる。そのため、170 °C で XRD 測定し、その回折パターンを Figure 2-19(c) に示した。回折パターンは結晶性を示し、Form A-1 と比べると 18 ° 以下の回折角がわずかにシフトし、対応する面間隔が拡大していることが示唆された。無水物であるが、Form H-1 と構造が異なっており、Form A-2 と命名した。その後、この結晶を冷却し、25 °C で XRD 測定した。その回折パターンを Figure 2-19(d)

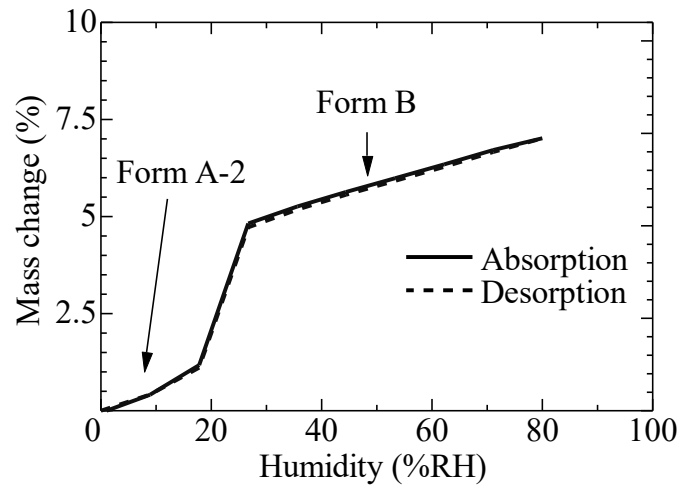


Figure 2-20 The water absorption and desorption curves of Form A-2 (the solid line) at 25 °C

に示した。回折パターンは、Form A-2 と同様であった。そのため、冷却することによる転移は生じていないことがわかった。Form A は乾燥と加熱を行うことで、エタノールと水が脱離して Form A-2 になることがわかった。次に、Form A-2 の相対湿度に対する変化を調べるため、水の吸脱着挙動を確認した。

Form A-2 を 0 %RH 環境に置き、80 %RH まで徐々に相対湿度を高くし、その後、80 %RH から 0 %RH に湿度を下げた。Figure 2-20 に得られた水の吸脱着曲線を示した。Form A-2 は、湿度 20 %RH までに 1.1 wt% (0.3 等量) の水を吸着し、25 %RH を超えたとき 4.7 wt% (1.4 等量) の水を吸着した。その後、相対湿度に比例して、80 %RH で 7 wt% (2.1 等量) まで水を吸着した。80 %RH に到達後、相対湿度を下げたところ、25 %RH まで比例して水を脱着し 4.9 wt% (1.5 等量) まで水を脱着した。25 %RH から 20 %RH にかけて、1.2 wt% (0.4 等量) まで水を脱着し、0 %RH で元の重量に戻った。Form H の吸脱着曲線のようなヒステリシスがないことがわかった。

水を吸着した多形を調べるために、70 %RH の XRD を測定し、Figure 2-19(e)に回折パターンを示した。回折パターンは Form A-2 に非常に似ており、 2θ として 20° 以下の回折角がわずかにシフトし、対応する面間隔は縮小していることが示唆される。こ

の多形を Form B ($\text{CS-023}\cdot\text{3/2H}_2\text{O}$) と命名した。Form A-2 と Form B の吸脱着曲線にはヒステリシスが見られなかった。これは、大きな構造変化がないためであると考えられる。このようにして、新たな水和物の結晶である Form B ($\text{CS-023}\cdot\text{3/2H}_2\text{O}$) が取得できることが明らかとなった。

そこで、新たな水和物 Form B が医薬品原薬候補になりうるかを調べるために安定性試験を実施した。Form H との比較で粒子径の影響を排除するため、Form A を湿式ジェットミルにて水溶液中で粉砕した。Form H と同様に、粒子径（メジアン径）が $6.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ となるまで結晶を粉砕した。粉砕後、ろ過・乾燥・調湿し、Form A-1、Form A-2 を経て Form B に転移するプロセスでサンプルを作製した。そして、固体の安定性試験を実施した。Form B は、0 %RH では Form A-2 に転移するが、Figure 2-21(a)に示すように安定であった。一方、75 %RH では Figure 2-21(b)に示すように Form H より安定性が低いことがわかった。そのため、Form B は Form H より医薬品原薬として適していないことがわかった。Form B から Form H の転移を促進させるために、さらに湿度を高くすることを試みた。相対湿度を 0 %RH から 95 %RH とすると、Figure 2-22 の実線の赤の吸収曲線に示すように、Form B は 80 %RH 以上の高湿度環境で 7.4 等量相当の水を吸着し、その後、重量減少し 6.0 等量の重量で安定化した。重量変化が安定化した 90 %RH での回折パターンを Figure 2-19(f)に示した。この結晶は、Figure 2-19(g)の Form H の回折パターンと一致しており、Form B から Form H に変化したことがわかった。その後、相対湿度を下げたところ、実線の青の脱離曲線を示した。再び、湿度を変化させた吸収と脱離は、点線の赤と青の吸収と脱離を示した。この吸収と脱離は、Figure 2-6に示す Form H と Form H-1 の変化に等しい水の吸収と脱離を示した。

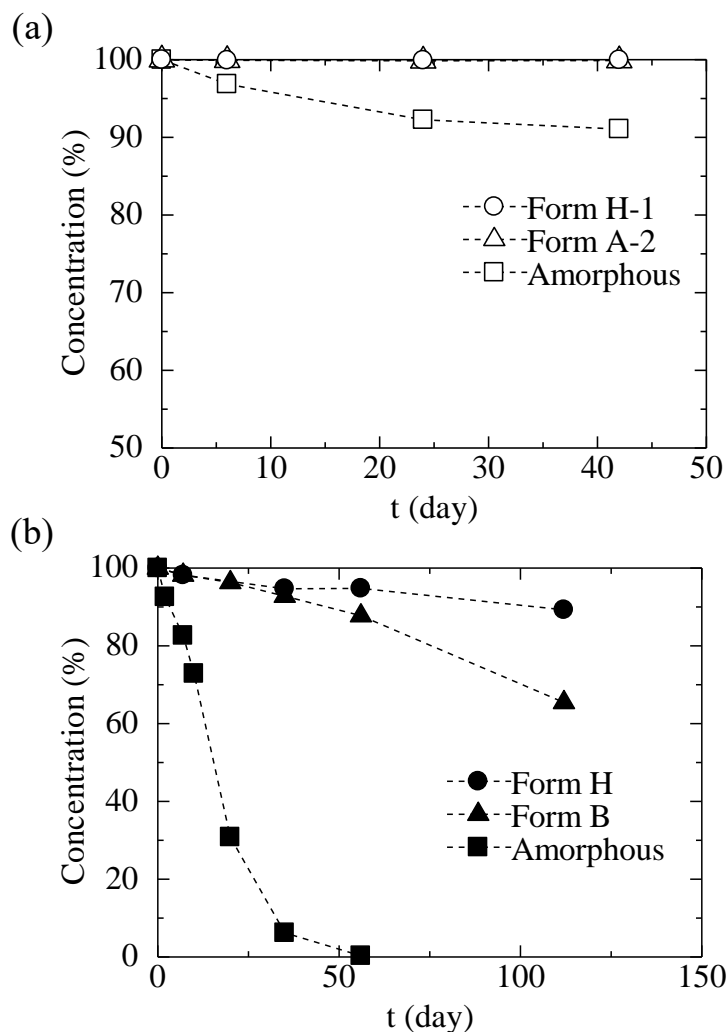


Figure 2-21 Stability of solid CS-023 at 40 °C under humidity conditions at: (a) 0% RH, (b) 75% RH

さらに、Form A-1 から Form B を経由して、Form H に変化させた際の顕微鏡写真を Figure 2-23 に示した。顕微鏡のステージ上で、Form A-1 (Figure 2-23(a)) を静置し、相対湿度 50 %RH にして 1 日経過した写真を Figure 2-23(b) に示し、その後、90 %RH にして 1 日経過した写真 Figure 2-23(c) に示した。Form A-1 から Form H に変化するまで常に偏光色があることが観察された。それゆえ、Form A から水和物 Form H に固相転移したことを再確認することができた。以上の Form A から Form H への転移の経路を Figure 2-24 にまとめた。

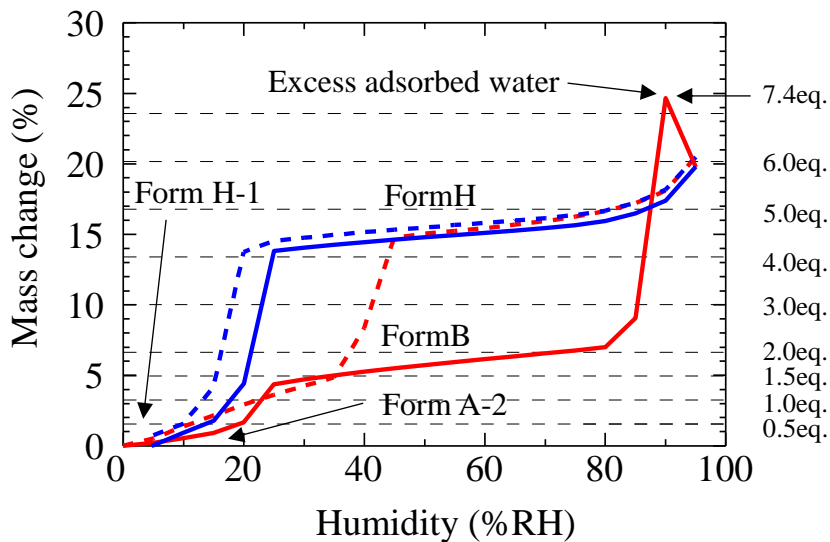


Figure 2-22 The water absorption and desorption curves for transition from Form A-2 to Form H at 25 °C: Absorption (red), Desorption (blue), 1st cycle (solid curve), 2nd cycle (dotted curve)

Form A から Form A-2 への固相転移は、エタノールと水が脱離して生じるため分解の心配は少ないが、Form A-2 から Form B への転移は、過剰な水による急速な分解を伴う可能性があった。使用した CS-023 の純度は 99.5%であり、出発点の Form A の純度は HPLC で 99.6%であった。最終的に得られた Form H の純度は Form A と同じであり 99.6%であった。Form A-2 から Form B への固相転移で分解は生じていないことがわかった。Form A 及び Form H で認められた純度の増加は、晶析の精製効果によるものである。冷却晶析では 50%分解するのに対し、Form A を経由した固相転移では、Form A の貧溶媒晶析で 2%分解するが、固相転移では 0%であった。したがって、分解を抑制して開発候補の多形である Form H を製造する新たなプロセスが見出された。

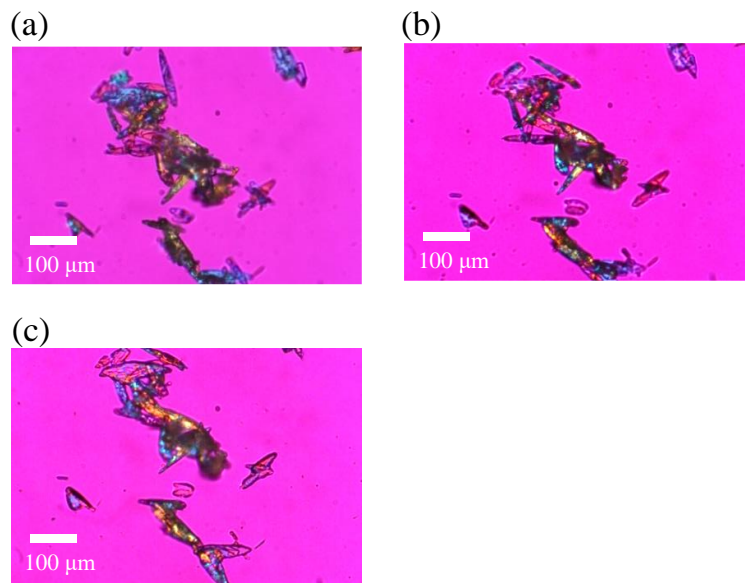


Figure 2-23 Polarized microscope images during the transition from Form A-1 to Form H:

(a) Form A-1, (b) after one day at 50 %RH, (c) after an additional day at 90 %RH following (b)

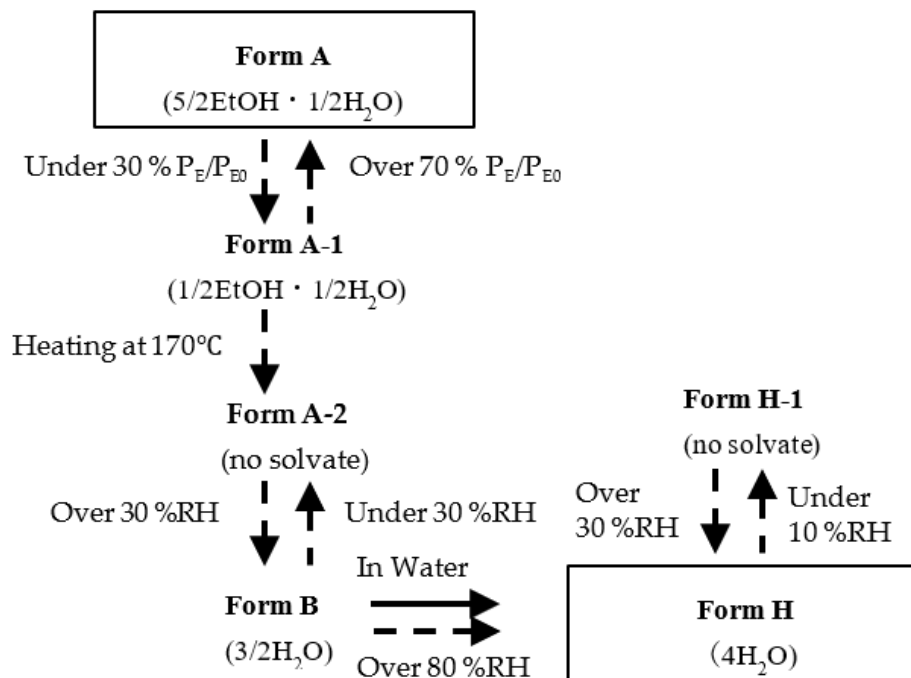


Figure 2-24 A solid-phase transition diagram from Form A prepared by anti-solvent crystallization to Form H

2.4 結言

CS-023 の冷却晶析を 25 °C の水溶液で行うことで、Form H (CS-023·4H₂O) が得られた。得られた水和物とアモルファスの安定性を比較した。アモルファスは不安定であったが、Form H は医薬品形態の多形になりうることがわかった。しかし、CS-023 は水溶液中では不安定で、70 °C では約 3 時間で半減する。Form H を得るための水溶液からの冷却晶析では、70 °C での溶解プロセスが含まれる。そのため、スケールアップして製造するには加熱冷却に時間がかかり、加水分解の問題があることがわかった。

そのため、25 °C で短時間で晶析が完了できる貧溶媒晶析を試みた。80 v/v% エタノール水溶液による貧溶媒晶析により Form A (CS-023·5/2EtOH·1/2 H₂O) が得られた。エタノールを含む Form A は医薬品としては適さないが、この多形を起点として、固相転移を経て Form H を得た。分解を抑制して開発候補の多形である Form H を製造する新たなプロセスが見出された。

引用文献

- 1) Loftsson, T., Drug Stability for Pharmaceutical Scientists, 1st ed., *Academic Press: Oxford, UK.*, 63-102, 2014.
- 2) Hickey, M. B., Peterson, M. L., Manas, E. S., Alvarez, J., Haeffner, F., Almarsson, Ö., Hydrates and Solid-State Reactivity, A Survey of β -Lactam Antibiotics., *J. Pharm. Sci.*, **96**, 1090-1099, 2007.
- 3) Mullin, J.W., Crystallization, 4th ed., *Butterworth-Heinemann: Oxford, UK.*, 181-215, 2001.
- 4) Khoshkhoo, S., Anwar, J. A. M. S. H. E. D., Crystallization of polymorphs: the effect of solvent., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **26**, B90, 1993.
- 5) Poornachary, S. K., Chow, P. S., Tan, R. B., Influence of solution speciation of impurities on polymorphic nucleation in glycine., *Cryst. Growth Des.*, **8**, 179-185, 2008.
- 6) Machiya, K., Ieda, S., Hirano, M., Ooshima, H., Effects of Impurities on Crystal Polymorphism of an Imidazopyridine Derivative Developed as a Drug Substance for Osteoporosis., *J. Chem. Eng. Jpn.*, **42**, 147-152, 2009.
- 7) S. Maruyama, H. Ooshima, Crystallization behavior of Taltirelin polymorphs in a mixture of water and methanol., *J. Crystal Growth*, **212**, 239-245, 2000.
- 8) Kitamura, M., Hara, T., Takimoto-Kamimura, M., Solvent effect on polymorphism in crystallization of BPT propyl ester., *Cryst. Growth Des.*, **6**, 1945-1950, 2006.
- 9) Xing, Z., Igarashi, K., Morioka, A., Ooshima, H. Repeated Cooling Crystallization for Production of Microcrystals with a Narrow Size Distribution., *J. Chem. Eng. Jpn.*, **45**, 811-815, 2012.

第3章 エタノール水溶液から析出する新しい多形

3.1 緒言

第2章では、水溶液中から CS-023 の Form H ($\text{CS-023}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 水和物結晶が得られた。Form H は医薬品原薬の開発候補になりえる結晶であった。しかし、水溶液において加熱および冷却時に加水分解するためスケールアップした際に収率が低下する懸念がある。80 v/v%エタノールを用いて貧溶媒晶析を行った結果、溶媒和物結晶の Form A が得られた。そして Form A から固相転移により Form H を取得できた。目的の多形を確実に取得するために ICH Q11¹⁾では製造上生じうる範囲を考慮し、デザインスペースによって品質を保証することが求められている。さらに、80 v/v%エタノール組成にするためにはエタノールを大量に使用するため、エタノールの削減が望ましい。そのため、本章では、Form A が安定的に得られるエタノール組成を探すために、エタノール組成が 80 v/v%以下の条件で、特に 20 から 70 v/v%のエタノール組成の範囲において貧溶媒晶析を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 晶析実験

20、40、50、60、70 v/v% エタノール組成下の貧溶媒晶析は以下の方法で行った。10 g の CS-023 が溶解した 25 °C の飽和水溶液 400 mL に、20、40、50、60、70 v/v%エタノール組成になるようにエタノールを加えた。所定時間後、析出した結晶を吸引濾過により回収し、晶析溶媒と同じエタノール組成の水溶液 40 mL で洗浄した。次いで、結晶を棚型乾燥機で 25 °C から 60 °C の所定温度、圧力 0.04 kPa で乾燥した。また、別の乾燥方法として、Figure 3-1 に示す 100 mL のミニコンカルドライヤーを用い、25 °C で圧力 1.6 kPa で乾燥させた。コンカルドライヤーの回転速度は 10 rpm に設定した。結晶

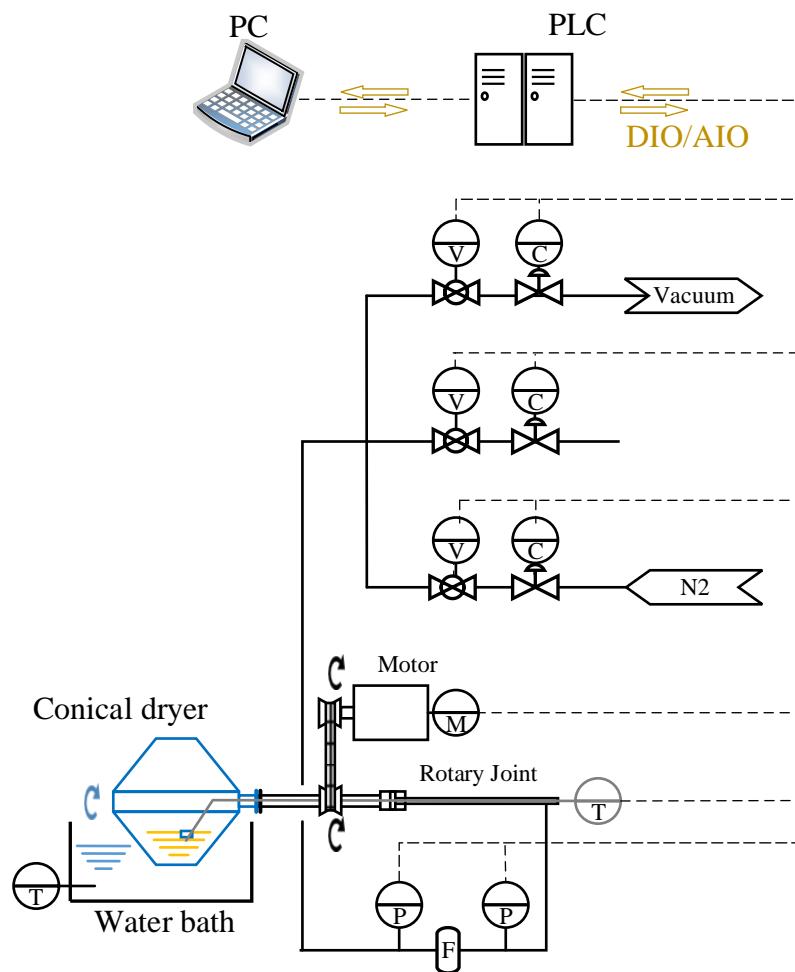


Figure 3-1 Drying experiment apparatus

中の水分量は、カールフィッシャー水分計 MKA-610（京都電子）で測定し、エタノール量は、CS-023 を水に溶解させて、ヘッドスペースサンプラー G1880 を備えたガスクロマトグラフ 6890N（Agilent Technologies）を使用して測定した。

3.2.2 単結晶 X線回折による結晶構造の決定

エタノール水溶液中の結晶構造を調べるために、単結晶構造解析を行った。単結晶を得るためにハンギングドロップ法による結晶化を以下の方法で行った。結晶化には、Hampton Research 製の結晶化セル(VDX Plate)を用いた。40 v/v% エタノール水溶液をリ

ザーバー溶液として、アルミニウム容器に 0.5 mL を加え結晶化セル内に静置し、25 mg/mL の CS-023 水溶液 0.04 mL をシリコン処理したカバーガラス上に吊り下げて 4 °C で 24 時間静置した。構造解析が可能なサイズまで成長した結晶を洗浄と乾燥は行わずナイロンループで掬い取り、以下の方法で単結晶構造解析を行った。測定は、150 K で MoK α 放射線 (0.7107 Å) を使用し、グラフィイトモノクロメーター MSC Mercury CCD (Rigaku) を使用した。構造決定は、SIR97²⁾ プログラムパッケージ CrystalClear (Rigaku) を用いて行った。構造最適化は、SHELXL-97³⁾ を使用した全行列最小二乗法によって実行した。すべての非水素原子は異方的に配置し、水素原子の位置は差分フーリエ法により求めた。水素原子はライディングモードで精密化した。

3.2.3 単結晶の顕微ラマンスペクトル測定

溶液中の結晶転移挙動を観察するために以下の方法で顕微ラマンスペクトルを測定した。ラマンスペクトル測定装置は inVia Qontor (Renishaw) を用いた。25 °C の飽和水溶液中に置かれた CS-023 単結晶に対し、長距離 50 倍対物レンズを備えた顕微鏡 DM2700M (Leica) を使用し、直径 2 μm のレーザービームを単結晶の様々な面に照射した。ラマン励起レーザーの波長は 532 nm で、出力は 5 mW (50 mW \times 10%) とした。各ラマンスペクトルは、総露光時間を 10 秒 (1.0 秒/回 \times 10 回) として、スペクトル領域 274~2008 cm^{-1} を分解能 1.5~1.9 cm^{-1} で取得した。

3.2.4 粉末 X 線回折 (XRD) 分析

粉末 X 線回折については、2.2.5 項で述べた方法で行った。

3.2.5 水とエタノールの吸脱着による転移実験

得られた結晶の吸着等温線は、DVS Advantage-1 (Surface Measurement Systems) を使用して、相対湿度 0%RH から 95%RH の範囲を 5%間隔で測定した。それぞれの湿度において、重量変化が 5 分間で 0.001%未満となったとき平衡であると判断した。吸着等温線の測定のために、サイズが異なる 2 種類の結晶 (29.1 μm と 0.24 μm) を用いた。後者の粒子は以下のように調製した。CS-023 結晶を 0.1 g/mL となるように 90 v/v% エタノール組成の水溶液に懸濁し、懸濁液 10 mL を湿式ジェットミル Nano Jet Pal JN 20 (常光) で粉砕した。粉砕された結晶を濾過し、96 v/v% エタノールで洗浄後、温度 25 °C、相対湿度 50 %RH 環境下に静置して、乾燥させた。粉砕後の粒子径はレーザー回折/散乱分析装置 LA 960 (堀場製作所) を用いて測定した。

3.3 結果と考察

3.3.1 70 v/v%エタノール下での CS-023 の結晶化

まず、70 v/v%エタノール水溶液となる条件でCS-023の貧溶媒晶析を行った。得られた結晶を濾過し、70 v/v%エタノール水溶液で洗浄し、棚型乾燥機で乾燥した。様々な乾燥条件で得られた結晶のエタノールと水の含量を Figure 3-2 に示した。プロットの横に乾燥温度と時間を示した。エタノールと水の含量は、CS-023 の含量を 100 wt%として計算した。Figure 3-2 から、温度が高いほどエタノールと水の含量は低い傾向にあるが、エタノールの含量は 2.8 から 6.2 wt%、水の含量は 0.6 から 1.13 wt%と広範囲に広がり定まっていないことがわかった。

80 v/v%エタノールの貧溶媒晶析で得られた Form A ($\text{CS-023} \cdot 5/2\text{EtOH} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) のエタノールと水の含量は、エタノールは 21.4 w%、水は 1.68 w%に相当する。当初、80 v/v%以下のエタノール組成で回収された結晶もすべて Form A であると期待されたが、結晶中の溶媒組成が一定でないことから、異なる多形が様々な割合で混ざった混合物である可能性があり、同様の結果が 20、40、50 v/v%エタノール水溶液からの結晶化で得られた。そのため、乾燥の方法が適切でなかったことが原因と考えられた。棚型乾燥機を使用して乾燥を行った際、結晶中のエタノールおよび水が洗浄と乾燥の過程で脱離した可能性がある。

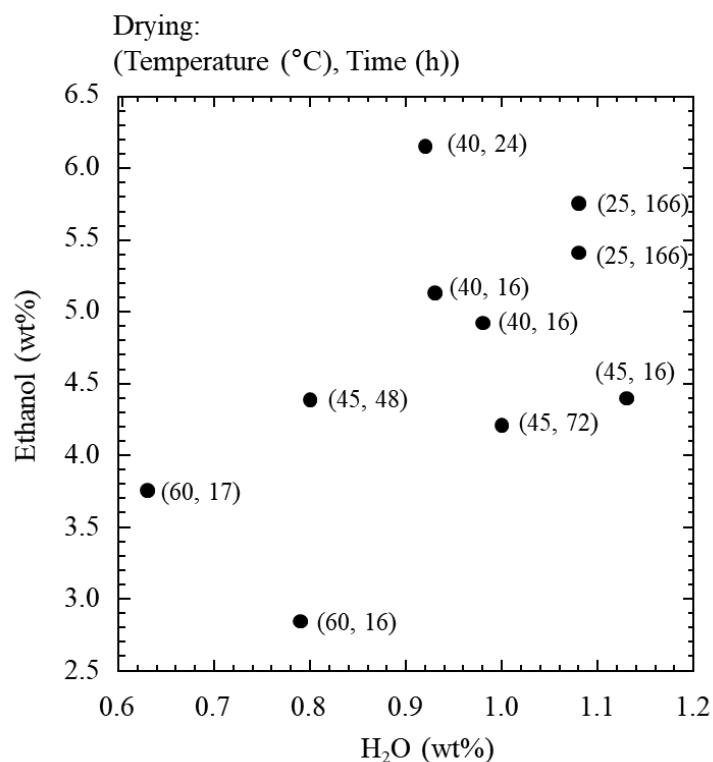


Figure 3-2 The composition of water and ethanol in crystals by anti-solvent crystallization from 70 v/v% ethanol after washing and drying. Washing: with 70 v/v% ethanol, Drying: at 25-60 °C and 0.04 kPa, for 16-166 h

3.3.2 エタノール水溶液中の CS-023 の多形

3.3.1 項で取得された結晶は、様々な割合のエタノールと水を含む結晶であった。それらがどのような多形であるのかを理解するには、まず、溶液中の多形を正確に同定することが重要であると考えた。そのため、単結晶を取得することを目的に、蒸気拡散による結晶化を試みた。約 $300 \times 100 \times 100 \mu\text{m}$ 角の単結晶が得られ、ナイロンループで拘束した単結晶の偏光顕微鏡写真を Figure 3-3(a)に示した。また、Figure 3-3(b)は、Figure 3-3(a)の状態を約 90° 回転した時の偏光顕微鏡写真である。そして、得られた単結晶の単結晶 X線構造解析を行い、結晶構造を特定した。同時に、結晶成長する面の

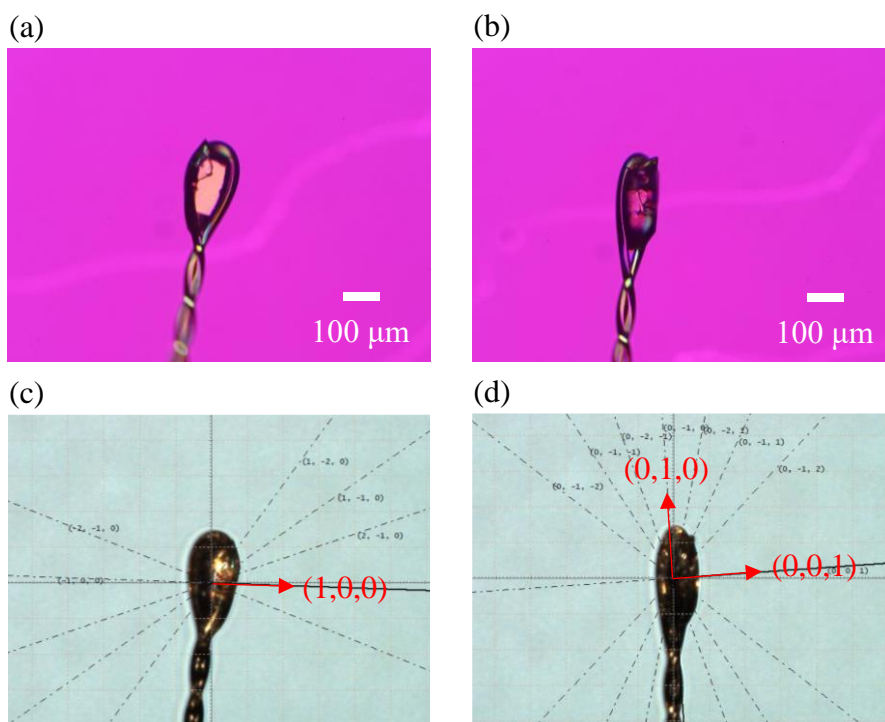


Figure 3-3 Microphotographs of the single crystal structured Form C: (a) A polarized microscopic photograph, (b) Rotated (a) by about 90 °, (c), (d) the Miller indices corresponding to (a), (b), respectively

ミラー指数を特定した。ミラー指数を特定した際の顕微鏡写真(c)、(d)は、偏光顕微鏡写真の(a)、(b)に対応しており、単結晶 X 線回折測定時に単結晶の成長面の指数付けが出来た。

単結晶構造解析によって結晶中の溶媒とエタノールの組成は、それぞれ 1.0 等量と 3.0 等量と決定され、 $\text{CS-023} \cdot \text{EtOH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ と同定された。これは、結晶中に含まれるエタノールと水として、それぞれ、10.04 wt%、8.5 wt%に相当する。Figure 3-4 に単結晶と Form A の回折パターンの比較を示した。単結晶の 2 次元の回折パターンは、単結晶の構造データを使用し、Mercury (CCDC) を用いて半値幅を 0.15 として生成した。この多形は Figure 3-4 から Form A と同じではないことが明らかとなった。この新たに同定された多形を Form C ($\text{CS-023} \cdot \text{EtOH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) と名付けた。この結果から、20 v/v%か

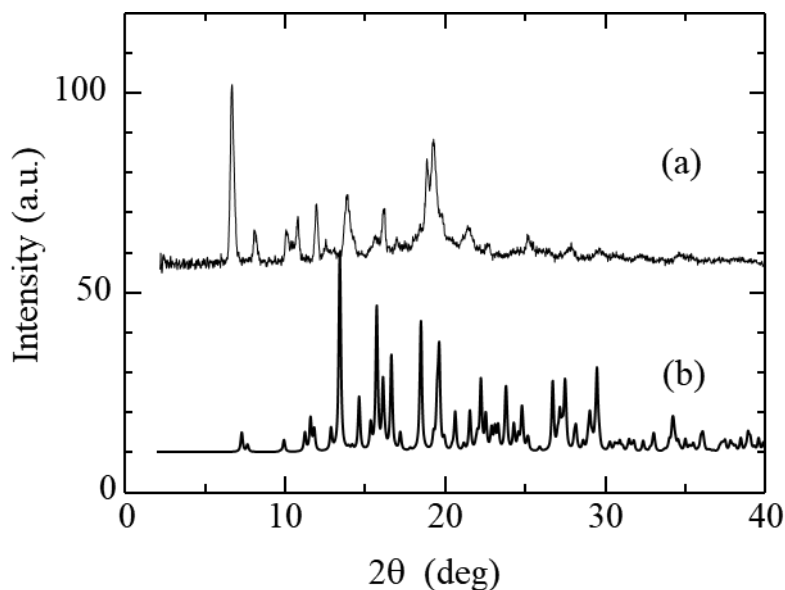


Figure 3-4 The comparison of the XRD patterns: (a) Form A, (b) Form C estimated from the crystallographic information data

ら 70 v/v% 以下のエタノール溶液から回収された結晶は Form C であることが示唆された。

3.3.3 Form C の水の吸脱着特性

平均粒子径が約 30 μm の Form C の結晶の水の吸収および脱離測定を行った。0 %RH から 90 %RH の湿度に対する吸脱着等温線を Figure 3-5 に示した。赤と青の実線は、それぞれ水の吸収と脱離を表している。そして、この吸脱着曲線の測定の間、エタノールは脱離しなかった（詳細は 4.3.1 項で説明）。脱離時には、相対湿度 15 %RH 以下で、3.0 等量の水に相当する 9.25 wt% の重量減少を示した。吸収時には、相対湿度が 0 %RH から 25 %RH の範囲で 9.25 wt% の重量増加を示した。

25 %RH から 95 %RH への吸収と 95 %RH から 15 %RH へ脱離過程において、9.25 wt% を超える水の吸着と脱着の質量変化を示した。Form H ($\text{CS-023}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) と Form B ($\text{CS-023}\cdot 3/2\text{H}_2\text{O}$) でも同様の緩やかな吸着と脱着現象が観察された。これは、X 線結晶構

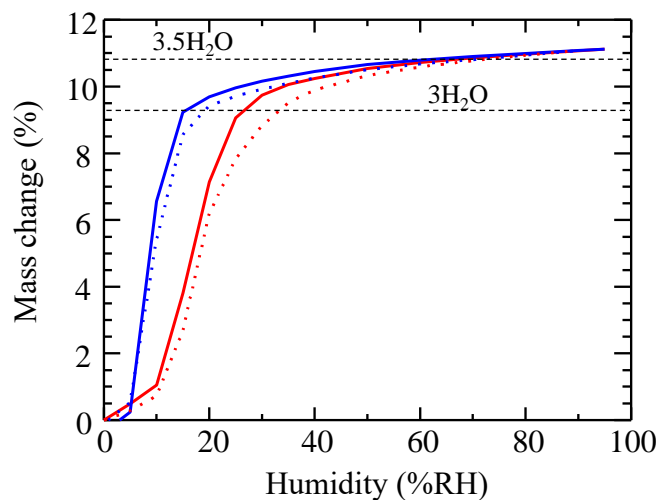


Figure 3-5 Water absorption and desorption isotherms on Form C washed with 96 v/v% ethanol: Absorption (red), Desorption (blue); Effect of crystal median size (d_{50}): 29.1 μm (solid curve), 0.24 μm (dotted curve)

造解析結果から得られた組成よりも多い水が吸着されたことを意味している。そのため、水の過剰分が、結晶表面での水の吸着によるものかどうかを確かめた。水の過剰分が結晶表面における多分子層の吸着・脱着であると仮定すると、粒子径によって表面積が変化すれば、吸着量が変わるはずである。そこで、粒子径を小さくするために湿式ジェットミルを用いて、メジアン径を 0.24 μm まで粉砕した結晶の吸脱着等温線を測定した。

結晶表面に水が吸着し、過剰量の吸着を引き起こしている場合、微粒子の総表面積は大きな粒子の総表面積よりも大きいため、小さな結晶に水を吸着させると過剰量が増加するはずである。体積が等しい粒子の粒子径が 121 分の 1 になれば、吸着量は 121 倍になるはずである。粒子径を小さくして吸着等温線を測定した結果を Figure 3-5 の点線で示した。ところが、29.1 μm の結晶と 0.24 μm の結晶の間で吸脱着曲線はほとんど差が見られなかった。したがって、 $3\text{H}_2\text{O}$ を超えて過剰に吸収された水は、粒子の表面積に依存しないため、表面への吸着ではないことがわかった。結晶表面への吸着でな

いのであれば、 $3\text{H}_2\text{O}$ 以上の過剰な水の吸収は結晶内部へ出入りする自由水によるものであると考えられる。この緩やかな吸収は、結晶構造やコンフォメーションを変化させる役割として水を吸収するわけではなく、結晶の内部の構造変化に大きく起因しない空隙（ボイド）に水が入ることによって引き起こされていると考えられる。相対湿度に応じて、このような非化学量論的な水和および脱水が生じることがエリスロマイシン A 結晶でも報告されている⁴⁾。

次に、重量減少した多形を調べるために、Form C を 0 %RH に静置して XRD 測定を行った。Figure 3-6 に回折パターンを示した。Form C と異なる多形であり、その多形を Form C-1 (CS-023·EtOH) と名付けた。そして、Figure 3-2 にある様々な乾燥条件で得られたいくつかの結晶の回折パターンを Figure 3-7(a)、(b)、(c) に示した。比較のため、Form H、H-1、C-1、C の回折パターンを示した。これらの結晶は、Form C-1 が主成分で、Form H、H-1 と Form C の混合物であったと考えられる。詳細は後述 (3.3.7 項) するが、エタノール水溶液中で Form C は安定晶であり、Form A は準安定晶である。また、Form H は Form C からの固相転移で取得可能である (4.3.1 項)。そのため、安定晶である Form C を確実に取得する方法を検討した。

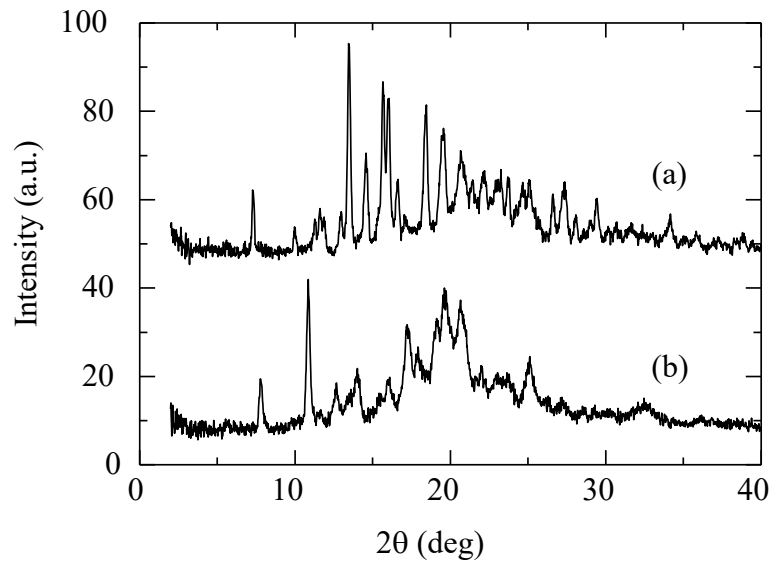


Figure 3-6 The XRD patterns of the crystals formed: (a) Form C, (b) crystals obtained at 0 %RH

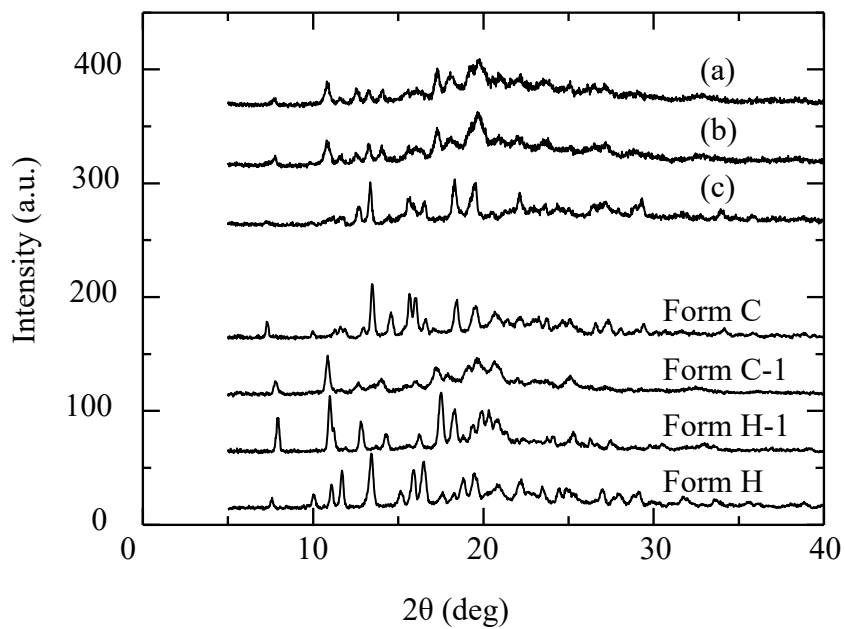


Figure 3-7 The XRD patterns of crystals washed with a 70 v/v% ethanol under various drying conditions at 25 °C for 166 h (a), at 40 °C for 24 h (b), at 60 °C for 16 h (c)

3.3.4 70 v/v%エタノール溶液から析出する CS-023 結晶の洗浄と乾燥

70 v/v%エタノール以下での貧溶媒晶析によって得られた結晶は乾燥条件によりエタノールおよび水の含量は、一定しないことがわかった。棚型乾燥機を使用して乾燥を行った際、結晶中のエタノールおよび水が乾燥の過程で脱離した可能性がある。従って、乾燥の方法が適切でなかったことが原因と考えられた。溶媒和物結晶の医薬品原薬結晶の洗浄中に脱溶媒するリスクが Douillet⁵⁾らによって明らかにされている。結晶化させる溶媒と異なる洗浄溶媒を用いると、結合していた溶媒分子が洗浄溶媒により除去され、所望した溶媒和物結晶が取得できず、無溶媒和物結晶に転移した。Hsieh らは、1 エタノール溶媒和物結晶から無水物結晶を得るためにメチル *t*-ブチルエーテル (MTBE) で洗浄後、乾燥した。彼らは、乾燥過程で無水物を得ようとしていたが、結晶中のエタノールは洗浄時に既に MTBE 中に脱離していたことを報告している⁶⁾。したがって、CS-023 においても乾燥条件だけではなく、洗浄条件も重要である可能性がある。そこで、確実に Form C を取得する、すなわち、一定のエタノールと水を含む結晶を得るために様々な洗浄と乾燥の方法を試みた。

まず、結晶を 75 v/v%エタノール水溶液で洗浄した。次に、伝熱の不均一性を少なくするためにミニコニカル乾燥機を使用して、温度 25 °C、圧力 1.6 kPa (相対湿度 50 %RH) で乾燥を試みた。Figure 3-8 は結晶の乾燥プロセス中のエタノールと水の含量を示している。Figure 3-8 では、参考として Form C の結晶構造解析で得られた含量となるエタノール 1.0 等量 (10.04 wt%) と水 3.0 等量 (8.5 wt%) の含量を点線と一点鎖線で示した。乾燥が所望通りに進めばこれらの線に一致するはずである。しかし、Form C のエタノール含量は、1.0 等量以下のレベルを超えて、7.7 wt%まで蒸発して減少し、その後一定の値となった。一方、水はエタノールより遅れて Form C の 3.0 等量以上の水和量よりも多い 12.4 wt%で一定となった。圧力を 0.04 kPa に変更すると、水分はほぼゼロまで低下したが、エタノールは変化しなかった。洗浄液として 75 v/v%エ

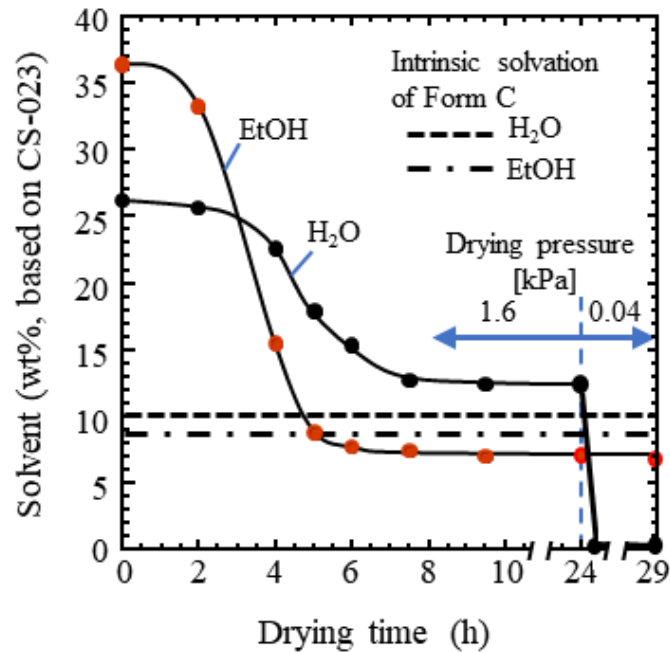


Figure 3-8 Residual solvents in the drying process at 25 °C and 1.6 kPa. Washing with 75 v/v% ethanol. Reference: Intrinsic solvation of Form C: 10.04 wt% H₂O (dotted line), 8.55 wt% EtOH (dashed line)

タノール水溶液を用いた場合、Form C と同じ多形を得ることが難しいことがわかった。そのため、よりエタノール組成を高くすることを検討した。

次に、洗浄液として 99.5%エタノールを用いて、25 °C、1.6 kPa で 12 時間乾燥させた。しかし、エタノールでは、洗浄中に結晶が小さく割れ崩壊していく様子が観察された。乾燥後の粉末をガスクロマトグラフィーと水分計で測定したところ、17.6 wt% のエタノールと 0.9 wt% の水が含まれていた。99.5 %エタノールによる洗浄は水がエタノールに拡散してしまい、Form C と同じ結晶を得ることが難しいことがわかった。

以上の結果から、乾燥挙動は Figure 3-9 に示すように説明できると考えた。まず、75 %エタノール水溶液で洗浄した直後の結晶内部と表面の液相は(a)の状態、結晶内部は EtOH·3H₂O である。乾燥過程では、液相から水に比べてエタノールが優先的に蒸発する。乾燥が進むと液相は減少するが、(b)のように結晶の表面は、水の組成が高く

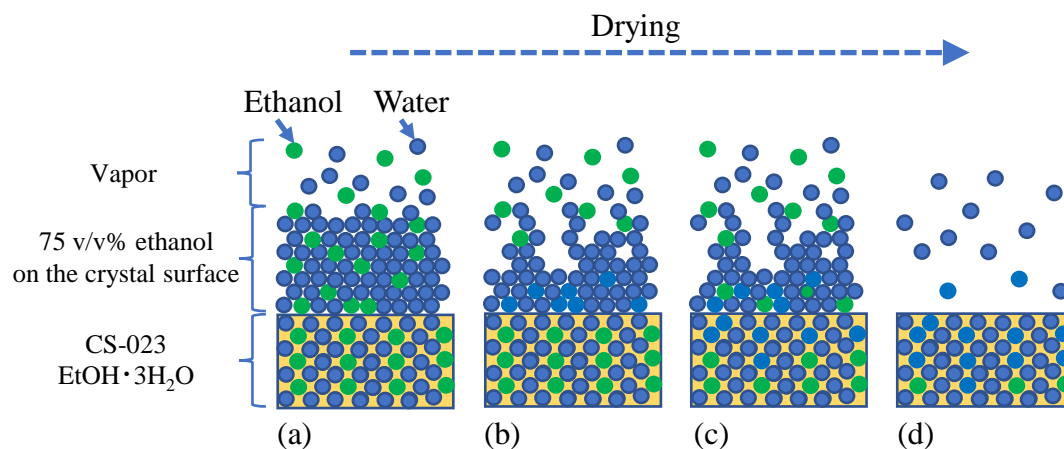


Figure 3-9 Behavior of the washing solvent during the drying of crystals: (a) Evaporation of solvent, (b) Preferential evaporation of ethanol and the formation of the water-rich phase in the vicinity of the crystal surface, (c) Diffusion of crystal ethanol to the water-rich phase and the reverse diffusion of water to the crystal inside, (d) Disappearance of solvent from the crystal surface and formation of the water-rich phase in crystals

なる。次に、(c)のように結晶中のエタノールは液相に拡散し、一方、水は結晶の内部に逆拡散する。そして、結晶表面の水が蒸発し、液相がなくなったところでそれらの拡散は止まる(d)。Figure 3-2 から予想されるように、結晶中のエタノールは時間の経過とともに減少するはずであり、(c)の状態では、結晶中のエタノールが結晶の外側の液相によって水に置き換わっているはずである。結晶の外側の液相はエタノール組成が共沸組成より低い場合、乾燥終了付近では気液平衡からほぼ水だけが残る。従って、(c)の状態にあるような、洗浄および乾燥中の溶媒和の状態を確かめることが重要である。しかし、結晶内部の水とエタノールを直接測定することは難しい。一方、結晶の顕微ラマンスペクトル測定による分析では、結晶の多形変化の情報を得ることができ、可能性がある。そこで、水溶液中で Form C がどのような変化を示すのかを知るために、顕微ラマンスペクトル測定を行った。

Form C に対する 25 °C の飽和水溶液中に単結晶の Form C を置き (Figure 3-10(a))、位

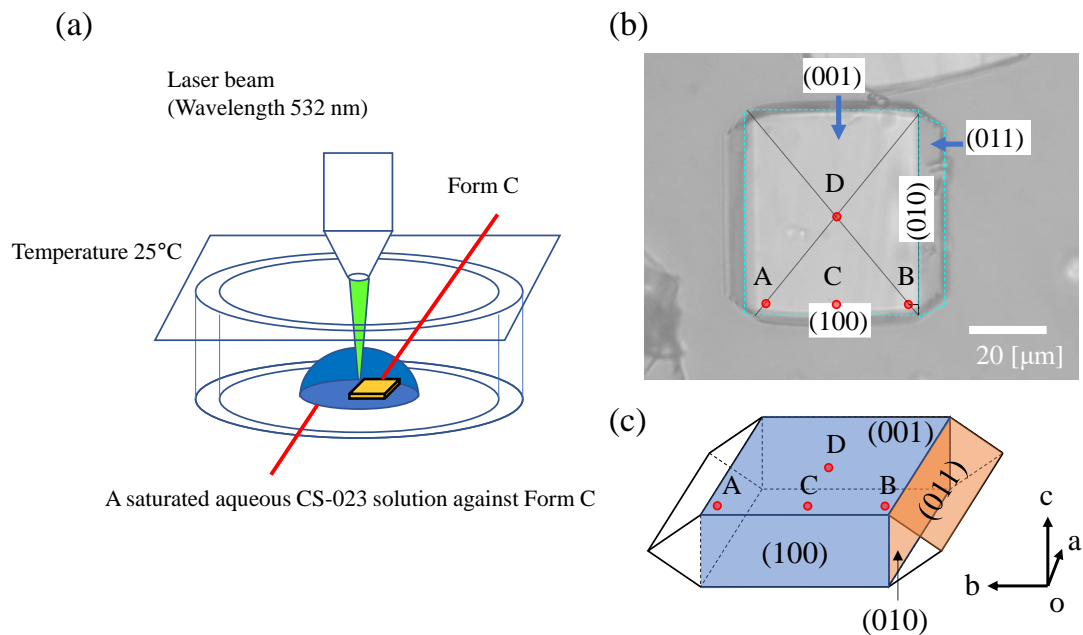


Figure 3-10 Raman spectroscopy measurement on Form C's (001) surface exposed by a saturated CS-023 solution: (a) Schematic of experimental apparatus, (b) Form C's (001) exposed surface: A, B, C, D: Laser beam irradiation sites, (c) Schematic of crystal appearance corresponding to the Miller indices

置指定が可能な電動ステージにより、単結晶の (001) 面上の A、B、C、D の部位にレーザービームを照射した (Figure 3-10(b))。D は、(001) 面の中心である。水中で取得される多形は Form H であるため、Form H の (001) 面に対しても顕微ラマンスペクトルを測定した。

飽和水溶液中での Form C と Form H の結晶の 1200 cm^{-1} から 1800 cm^{-1} のラマンスペクトルを Figure 3-11(a) に示した。 1386.4 cm^{-1} のピークは Form H では減少または消失しており、Form C の 1548.9 cm^{-1} のピークは Form H で 1558.7 cm^{-1} にシフトしている。波数の帰属は、Kalp⁷⁾ によるメロペネム、イミペネム、およびエルタペネムの測定結果を参考にした。 1386.4 cm^{-1} のピークは強度が低いですが、Figure 3-12 に示したサイト 2 のカルボキシル基の -C=O 対称伸縮由来である。Form H と Form C の単結晶構造解析結果 (4.3.3 項) から、Form C ではカルボキシル基の炭素と酸素の原子間距離は、 1.257 \AA と 1.252

Åであり、Form Hでは1.280 Åと1.247 Åであった。Form Hの2つの炭素と酸素の原子間距離は、酸素原子が水と水素結合することによって偏りがある。そして、炭素と酸素間の対称伸縮振動のラマンスペクトルは、対称性が高いほど強い強度で検出され、低いほど弱い強度で検出される。つまり、対称性が低くなることによって、ピーク強度は小さくなると予想される。

Form Hのラマンスペクトルにおいて1386.4 cm⁻¹の波数の強度が減少または消失するのは、水との水素結合によって対称伸縮する分子の割合が少なくなっているためである。カルボキシル基は、Form Cではエタノールと、Form Hでは水と水素結合を形成し、Form Hは水との強い水素結合によって、ピーク強度が低下したと言える。1548.9 cm⁻¹の波数は、Figure 3-12に示すサイト1のπ電子¹⁾による特徴に相当し、1558.7 cm⁻¹へのシフトは、2面のねじれ角C=C-S-Cの変化に依存していると考えられる¹⁾。単結晶構造解析からForm C、Form Hの2面のねじれ角は、それぞれ142.04°、137.99°であり、ねじれ角の変化によってラマンシフトが10 cm⁻¹変化したと考えられる。

Figure 3-11(b)は、レーザー照射点A、B、C、Dにおけるラマンスペクトルの時間変化を示している。すべての点で、1386.4 cm⁻¹のピーク強度の減少と、1548.9から1558.7 cm⁻¹のピークトップのシフトが観察された。Form CからForm Hへの転移であると考えられる。1386.4 cm⁻¹のピーク強度の減少とピークトップのシフトはAとBでは30 min後に始まっていたが、CやDではそれらの変化は大きくない。120 min後では、CやDでも変化が見られた。したがって、水分子は(011)および(010)表面からForm Cの内部に入って行き、Form Cが部分的にForm Hと同様の構造に変化することが示されている。Form CからForm Hへの変化は、エタノールが脱離して水分子が吸収される過程であるので、ラマンスペクトル測定から得られた結果は、Figure 3-9に示した乾燥メカニズムを裏付けていると言える。

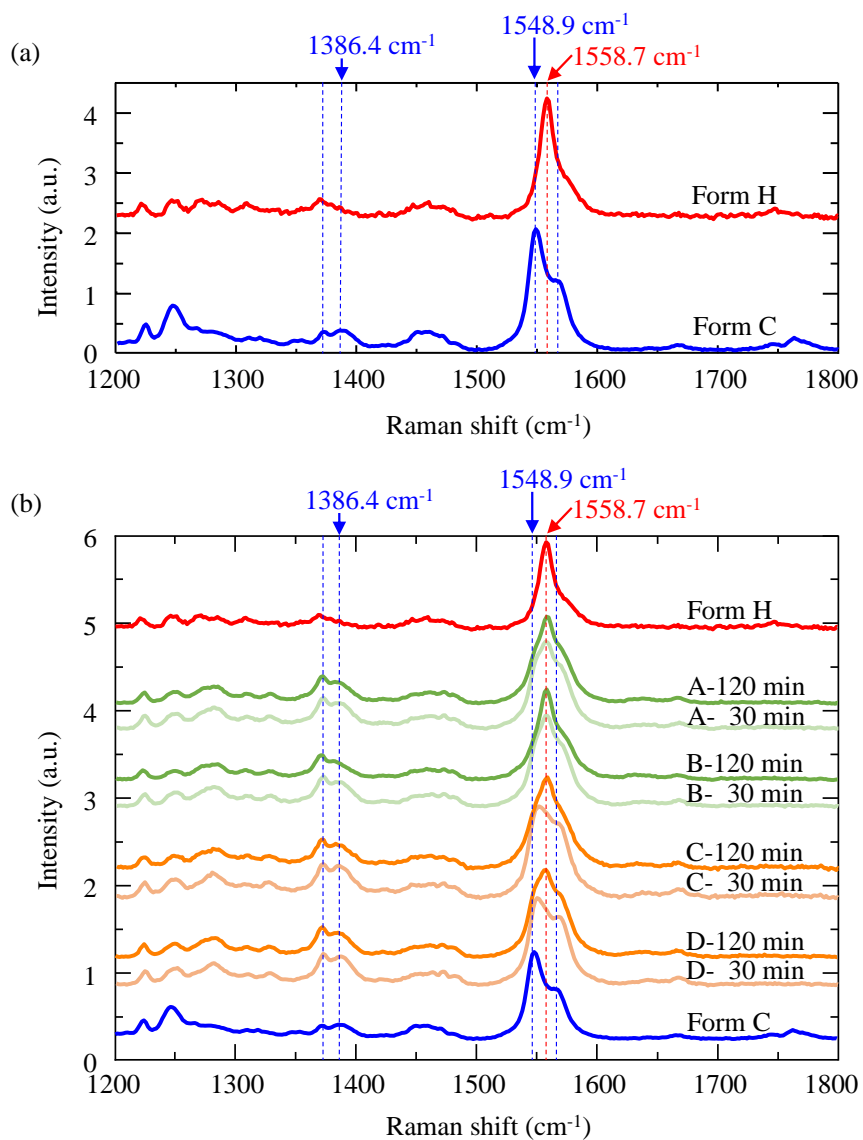


Figure 3-11 Raman spectroscopy data on Form C's (001) surface exposed by a saturated CS-023 solution. A, B, C, D: Laser beam irradiation sites. (a) a comparison of Raman shift between Form C and Form H. (b) the changes in raman spectroscopy with elapsed time

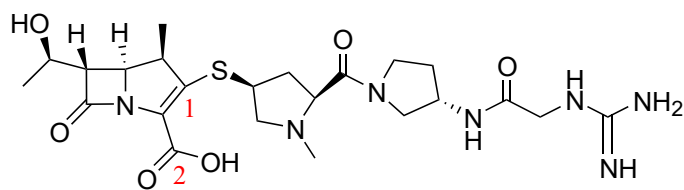


Figure 3-12 Chemical structure of CS-023

3.3.5 70 v/v%エタノール溶液から回収した CS-023 結晶の洗浄および乾燥の改善

3.3.4 項では、Form C が水溶液中で Form H に変化することを示した。確実に Form C を得たい場合に乾燥プロセスで重要なことは、結晶の外側で結晶中のエタノールの拡散を誘発する高い水分濃度の液相を生成させないことである。また、液相のエタノール組成が高いときに結晶内部のエタノール組成が変化しないことが明らかになれば、Figure 3-9 に示す乾燥メカニズムも合理的であることが証明される。そこで、高いエタノール濃度の液相を維持する方法、つまり、エタノールと水が同じ速度で蒸発するバランスの取れた乾燥プロセスを実現するために、洗浄溶媒を共沸エタノール/水混合物に近い 96 v/v%エタノールに変更した。

Figure 3-13 に 96 v/v% エタノールで洗浄した結晶の乾燥プロセス中のエタノールと水の経時変化を示した。結晶中のエタノール分子の脱離を誘発する可能性のある高い水分濃度の液相を生成させない共沸組成の洗浄溶媒を用いたことにより、予想通り、Form C と同じエタノール・水の含量を有する結晶を取得することが出来た。Figure 3-14 に得られた結晶の回折パターンを示した。乾燥後の結晶の回折パターンから単結晶構造解析により決定された Form C と同じ多形であることが確認された。したがって、エタノール/水系での晶析で生成する Form C の結晶を安定的に取得するには、晶析後の液相が十分に置換される量の 96 v/v%エタノールを用いて洗浄してから乾燥することが最適であると結論付けられる。

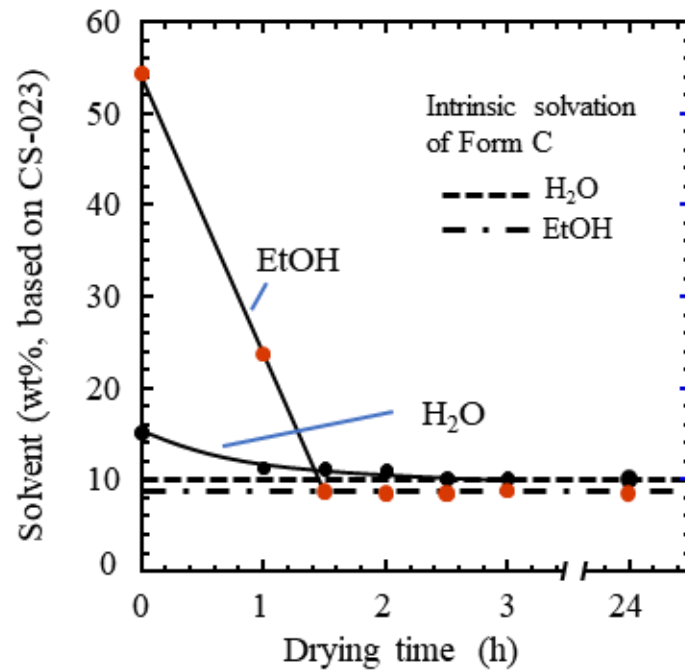


Figure 3-13 Residual solvents in the drying process at 25 °C and 1.6 kPa. Washing with 96 v/v% ethanol. Reference: Intrinsic solvation of Form C: 10.04 wt% H₂O (dotted line), 8.55 wt% EtOH (dashed line)

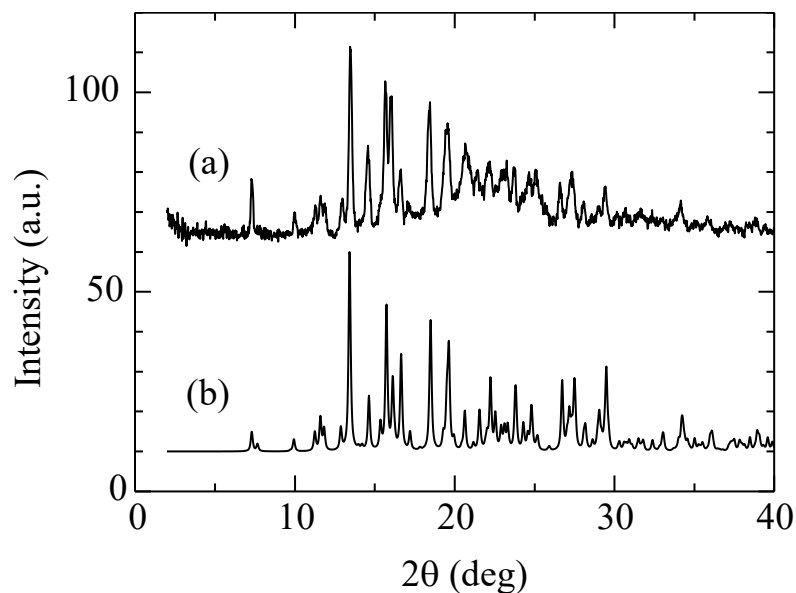


Figure 3-14 The comparison of the XRD patterns: (a) the crystals recovered from 70 v/v% ethanol solution, (b) Form C calculated from the crystallographic information data

3.3.6 適切な洗浄と乾燥による 70 v/v%組成以下のエタノール水溶液中での貧溶媒晶析による Form C の取得

70 v/v%組成以下のエタノール水溶液中でも、洗浄乾燥が適切であれば、Form C を取得できるのかを検討した。エタノール組成を 20 v/v%および 50 v/v%とした過飽和溶液を調製し、貧溶媒晶析を行った。十分に結晶が析出した後、ろ過し、96 v/v%エタノールで洗浄した。その後、25 °C、圧力 1.6 kPa で乾燥した。20 v/v%エタノール水溶液から得られた結晶の顕微鏡写真を Figure 3-15 に示す。平均粒子径は約 30 μm であった。

20 v/v%および 50 v/v% エタノール溶液から回収された結晶の回折パターンを Figure 3-16 に示した。これらは、70 v/v%エタノール組成と同じ Form C であった。したがって、Form C を安定的に取得するには、適切な洗浄溶媒組成と乾燥条件が重要であることがわかった。

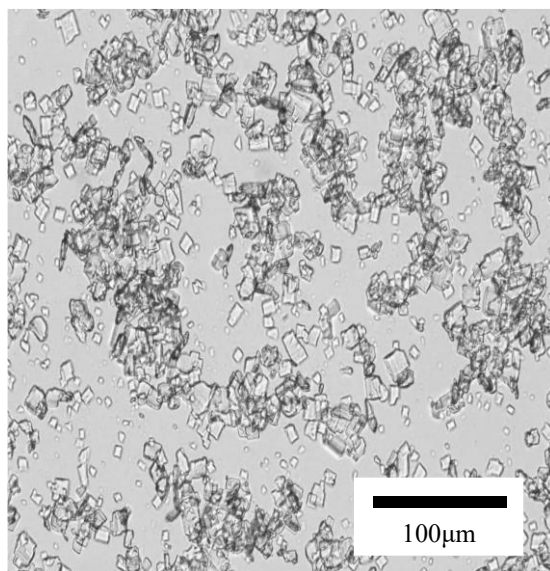


Figure 3-15 An optical micrograph of the CS-023 crystals obtained from ethanol 20 v/v% solution. Crystals were washed with 96 v/v% ethanol and dried at 25 °C 1.6 kPa

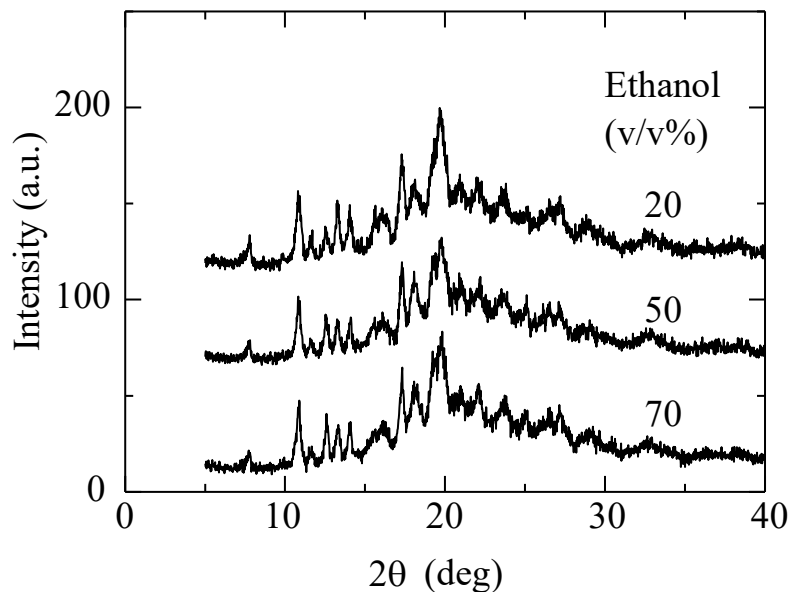


Figure 3-16 The XRD patterns for the crystals formed in less than 70 v/v% ethanol

3.3.7 Form A と Form C の関係

80 v/v%エタノール水溶液中では Form A が得られ、70 v/v%以下のエタノール水溶液中で Form C が得られた。そこで、2つの多形間の関係を調べた。まず、様々なエタノール組成における Form A と Form C の溶解度を測定した。Form A と Form C の結晶を 25℃のエタノール水溶液に懸濁し、所定時間後、液相中の CS-023 濃度を HPLC で測定した。Figure 3-17 は様々なエタノール組成における Form A と Form C の溶解度を示している。それぞれの溶解度はエタノール組成が高くなるとともに指数関数的に減少することがわかった。そして、すべてのエタノール組成の範囲で Form C の溶解度は Form A の溶解度よりも低かった。すなわち、エタノール水溶液中では、Form C が安定晶であり、Form A は準安定晶である。そのため、エタノール水溶液中で、Form A は溶媒媒介転移により Form C に転移すると考えられる。また、エタノール組成が低くなるにつれて Form A と Form C の溶解度の差は広がることがわかった。したがって、転移速度はエタノール組成に依存する可能性がある。

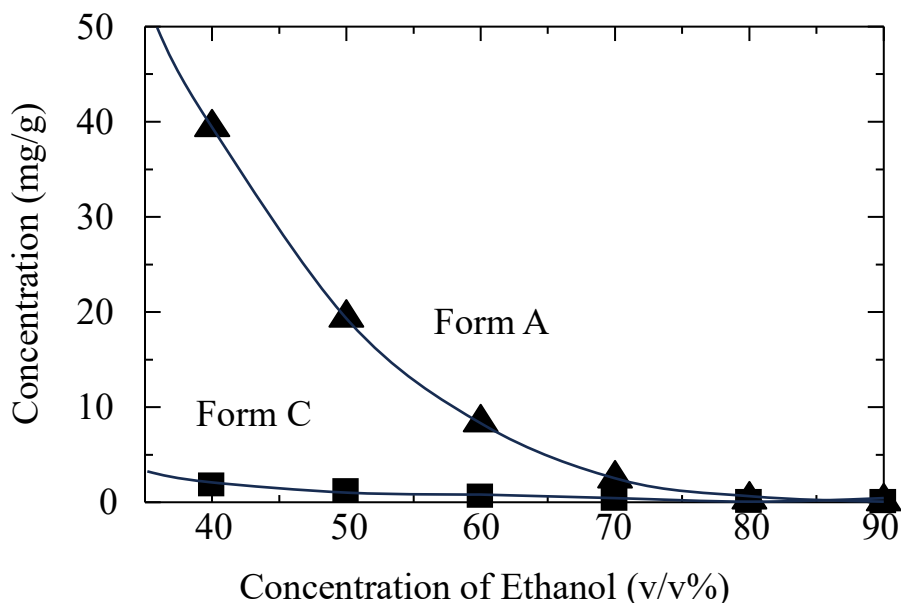


Figure 3-17 Solubility of Form A and Form C at 25 °C in ethanol solution

そこで、Form A から Form C への溶媒媒介転移について検討した。25 °Cの 40、70、および 80 v/v%エタノール水溶液に Form A を加えて攪拌し、CS-023 の溶液濃度変化を測定した。Figure 3-18は、3つのケースすべてにおいて、溶液濃度がしばらくの間 Form A の溶解度に保たれ、その後、Form C の溶解度まで減少した。溶液濃度が Form C の溶解度に達した後、結晶を回収し、XRD 測定を行った。その結果、すべて Form C であったことから、溶媒を介して Form A から Form C に転移したことがわかった。40 v/v%と 70 v/v%では、速やかに Form C に転移しており、80 v/v%エタノール組成では転移速度は遅くなった。一般的に、準安定晶と安定晶が存在する系では、過飽和溶液から準安定晶が先に析出することが知られている。そのため、70 v/v%以下でも Form A が析出していた可能性があるが、転移速度が速いため Form C が得られたと考えられる。一方で、80 v/v%以上のエタノール組成で Form A が取得出来ていたのは、転移が遅いため、Form C が析出する前に回収できていたからであると考えられる。Form A を安定的に取得するには、Form A から Form C への溶媒媒介転移が始まる前に、結晶周囲から溶媒を

除去する必要がある。そのため、Form A は安定的に取得することが難しい多形であることがわかった。

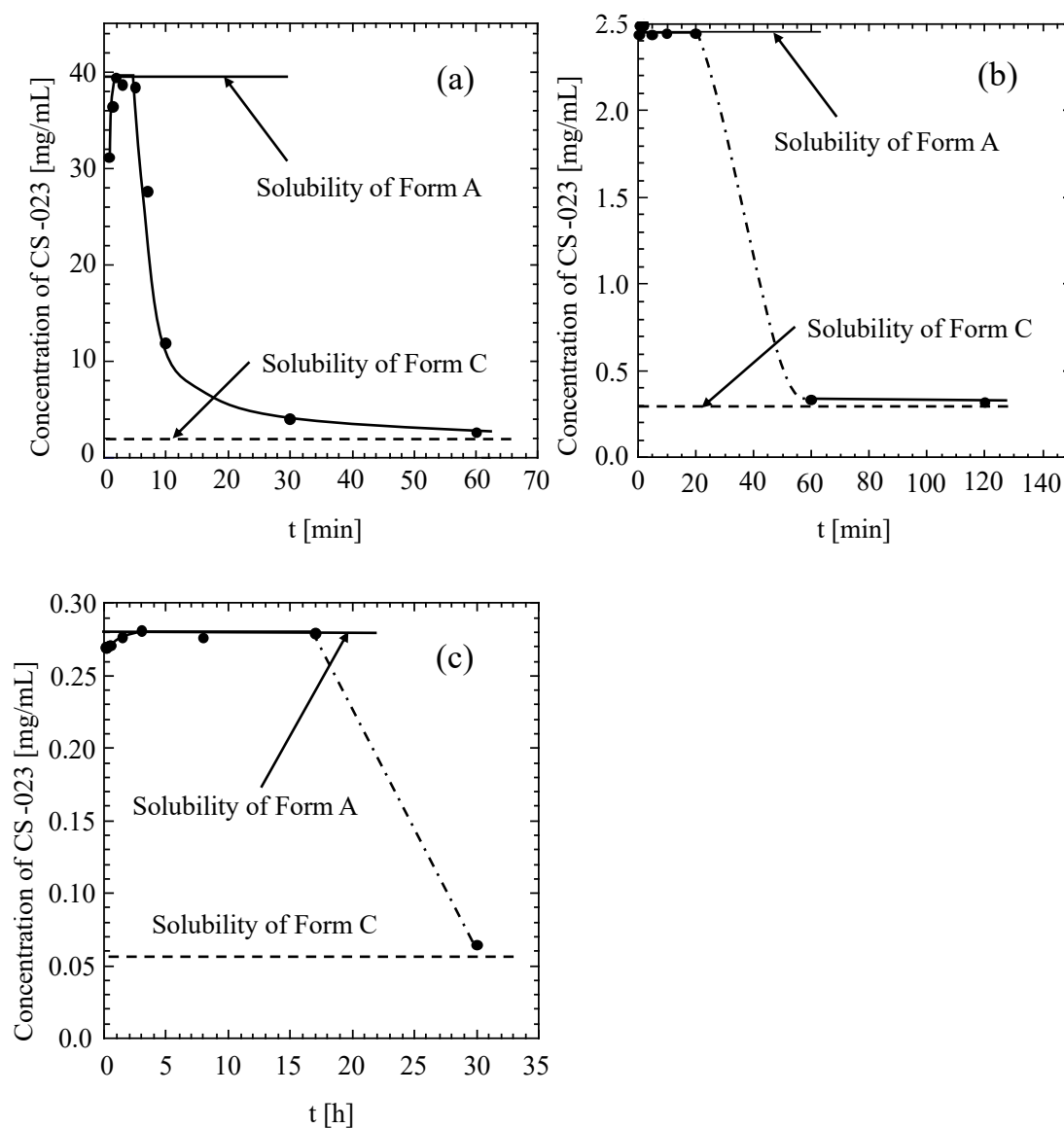


Figure 3-18 Changes in the concentration of CS-023 during the solvent mediated transformation of Form A to Form C at 25 °C. Solvent and the prepared Form A slurry: (a) 40 v/v% ethanol, 56 mg/mL, (b) 70 v/v% ethanol, 30 mg/mL, (c) 80 v/v% ethanol, 3 mg/mL. Form C was recovered after (a) 60 min, (b) 60 min, (c) 30 h

3.4 結言

Form A の安定的な製造を目的として、幅広いエタノール組成で貧溶媒晶析を行った。70 v/v%以下のエタノール水溶液における貧溶媒晶析を行い、結晶化させた溶媒と同じエタノール組成の溶液で洗浄し、様々な温度で乾燥させると、様々なエタノールと水の組成を持つ結晶が得られた。溶液中の多形を特定するため、70 v/v%以下のエタノール中でハンギングドロップ法による結晶化を行った。単結晶 X 線回折分析をすることによって Form C ($\text{CS-023} \cdot \text{EtOH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) を同定した。

次に、75 v/v%エタノール水溶液を洗浄溶媒として使用して 25 °C、1.6 kPa で乾燥を行ったところ、Form C と同じ溶媒和物結晶を取得することができなかった。その原因として、結晶周辺の液相と結晶間でエタノールおよび水分子の置換が起っていると考えられた。そこで、水溶液中で Form C の顕微ラマン測定を行ったところ、Form H への転移が観察された。これは、エタノールおよび水分子の置換が起っていることを示唆している。乾燥中でも同様なことが起こる可能性が考えられたため、洗浄に用いるエタノール組成を検討した。その結果、96 v/v%エタノールを洗浄溶媒として使用すると、期待通りの結果が得られた。したがって、Form C の工業生産に役立つ洗浄および乾燥方法が確立された。本化合物のような異なる沸点成分を含んで構成される多成分系の溶媒和物結晶に使用されることで、目的に応じた結晶を取得することが期待できる。

Form A は Form C に比べて溶解度が高く準安定晶であった。そして、80 v/v%のエタノール組成の溶媒中以外では、Form A は Form C に速やかに溶媒媒介転移した。そのため、エタノール水溶液では Form A は取得できる範囲が狭いことがわかった。

引用文献

- 1) Guideline, I. H. T., Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities) Q11. *London: European medicines agency*, 2011.
- 2) Altomare, A., Burla, M. C., Camalli, M., Cascarano, G. L., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Moliterni, A. G. G., Polidori, G., Spagna, R., SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement., *J. Appl. Cryst.*, **32**, 115-119, 1999.
- 3) Sheldrick, G. M., Schneider, T. R., [16] SHELXL: High-resolution refinement., *In Methods in enzymology*, **277**, 319-343, 1997.
- 4) Fujii, K., Aoki, M., Uekusa, H., Solid-state hydration/dehydration of erythromycin A investigated by ab initio powder X-ray diffraction analysis: Stoichiometric and nonstoichiometric dehydrated hydrate., *Cryst. Growth Des.*, **13**, 2060-2066, 2013.
- 5) Douillet, J., Stevenson, N., Lee, M., Mallet, F., Ward, R., Aspin, P., Dennehy, D. R., Camus, L., Development of a solvate as an active pharmaceutical ingredient: Developability, crystallisation and isolation challenges., *J. Cryst. Growth*, **342**, 2-8, 2012.
- 6) Hsieh, D. S., Gao, Q., Huang, M., DiMemmo, L. M., Lindrud, M., Razler, T., From drying kinetics, solvate structure, particle morphology, and modeling to optimal drying protocol., *Org. Process Res. Dev.*, **21**, 1509-1520, 2017.
- 7) Kalp, M., Carey, P. R., Carbapenems and SHV-1 β -Lactamase Form Different Acyl-Enzyme Populations in Crystals and Solution., *Biochemistry*, **47**, 11830-11837, 2008.

第4章 固相転移のメカニズムに関する検討

4.1 緒言

多形の転移には、溶媒を媒介した溶媒媒介転移^{1,2)}と固相から固相に直接転移する固相転移がある。溶媒媒介転移は、製薬業界において重要な研究課題である^{3,4)}。一方、固相転移も、溶液からの結晶化による多形スクリーニングでは発見できない有用な多形を得るのに役立つ。ベンラファキシリン塩酸塩の新しい多形は、180-190 °Cで発見され、既存の薬剤多形よりも顕著に安定であることが示された⁵⁾。固相転移は、温度⁶⁾に加えて結晶内の欠陥の存在^{7,8,9)}、圧力¹⁰⁾、UV照射による光可逆反応¹¹⁾、溶媒蒸気¹²⁾など、さまざまな要因によって誘導される。多形間の固相転移に関しては、様々な速度論で議論されたメカニズムは理解されているが、特定の分子に対してどのように作用するかは、依然として予測が困難とされている¹³⁾。

固相転移は溶液と接することがないため、加水分解に耐えられない物質の結晶化に役立つと考えられる。第2章では、CS-023のエタノールと水を持つForm A (CS-023·5/2EtOH·1/2H₂O) の固相転移により、Form H (CS-023·4H₂O) を得た。エタノールと水を含む多形から水和物結晶への固相転移により、水溶液からの結晶化では避けられないβ-ラクタムの加水分解を回避した。そして、Form A から3つの多形を経由して、Form Hに変化する過程を特定し、効率的な回収方法を見出した。第3章では40 v/v%から70 v/v%のエタノール水溶液中でForm A より安定な多形Form C (CS-023·EtOH·3H₂O) が新たに得られ、Form Cを安定的に取得するための適切な洗浄・乾燥方法があることを見出した。

本章では、第3章で得られたForm CからForm Hへの固相転移を試みた。そして、第2章で得られたForm Aおよび、第3章で得られたForm CからForm Hへの固相転移のメカニズムに着目した。各多形の結晶構造を詳細に解析し、Form AおよびForm Cか

ら Form H への固相転移メカニズムについて検討した。

4.2 実験方法

4.2.1 Form H と Form A の単結晶の作製

Form H の単結晶を取得するために、水溶液からの冷却晶析を以下の方法で行った。CS-023 10 g を 50 mL の水に加え、70 °C に加熱して完全に溶解した。溶解後、0.2 μm メンブレンフィルターを用いてろ過した。溶液をシャーレに静置し、25 °C で静置した。結晶が析出して 24 時間後、析出した結晶周囲の溶液をピペットにて吸い取り、30 g/L の CS-023 水溶液で結晶周囲の溶液を置換した。その後、結晶の周囲の溶液をキムワイプでふき取り、60 %RH の相対湿度環境で乾燥した。その後、単結晶 X 線回折分析を行った。

Form A の単結晶を取得するために、貧溶媒晶析を以下の方法で行った。CS-023 5 g を 50 mL の水に加え、70 °C に加熱して完全に溶解した。溶解後、直ちに 25 °C に冷却し、0.2 μm メンブレンフィルターを用いてろ過した。ポリエチレンフィルムを敷いたシャーレにろ過した溶液を移し、その溶液に 250 mL のエタノールを加え、25 °C で静置した。結晶が析出して 5 時間後、析出した結晶周囲の溶液をピペットにて吸い取り、96 v/v% 組成のエタノール水溶液で結晶周囲の溶液を置換し、洗浄と乾燥は行わず単結晶 X 線回折分析を行った。

4.2.2 単結晶 X 線回折による結晶構造の決定

単結晶 X 線回折による結晶構造解析は、3.2.2 項と同じ方法で測定と解析を行った。

4.2.3 熱分析

温度変化に伴う重量変化 (TG) は、2.2.4 項と同様の方法で測定した。また、転移に伴う熱量変化を調べるために示差走査熱量計 (DSC) X-DSC7000 (日立ハイテクノロジーズ) を用いて熱分析を行った。試料約 10 mg を開放型のアルミ製パンに置き、100 mL/min の窒素環境下で 10 °C/min の速度で 25 °C から 180 °C までに昇温し、熱量変化を測定した。

4.2.4 Form C の相転移挙動実験

XRD による固相転移の確認は、2.2.5 項と同様の方法で様々な温度と湿度で測定した。偏光顕微鏡観察による形態観察は、2.2.6 項と同様の方法で様々な温度と湿度で行った。また、Form C-1 の形状観察には電子顕微鏡 VE-7800S (キーエンス) を用いた。

4.2.5 Form C の電子密度等価面の作成

CS-023 の水およびエタノールの脱離を結晶構造から考察するために、以下の方法で電子密度等価面を作成した。enCIFer¹⁴⁾ (CCDC) を用いて、結晶構造解析で得られた Form C の構造から水とエタノールの分子を除き、単位格子中に CS-023 分子のみの座標データを作成した。その後、CrystalExplore¹⁵⁾ を用いて様々な電子密度を設定し、その等価面を作成した。また、水とエタノールの分子体積の計算にユーザーインターフェースとして Winmostar を用い、半経験的量子力学計算ソフトウェア (MOPAC6) を使用した。分子軌道計算の演算子 (ハミルトニアン) に AM1 を用いた。

4.3 結果と考察

4.3.1 Form C の相転移挙動

Form C のエタノールと水の脱離挙動を知るために、TG 測定を行った。Figure 4-1 は、Form C の温度に対する重量変化を示している。2段階の重量減少が見られ、約 80 °C までに 9.0 wt%、80 °C から 180 °C で 6.0 wt% が重量減少した。重量減少した成分を特定するために棚型乾燥機による昇温実験を行い、エタノールと水分を測定した。80 °C ではエタノールは 6.5 wt%、水分は 0.5 wt% であった。そして、150 °C では、エタノールは 0.1 wt%、水分は 0.2 wt% であった。したがって、TG 測定で 80 °C までに重量減少が観測された成分は 3.4 等量の水であり、80 °C から 180 °C にかけて重量減少する成分は 0.8 等量のエタノールであることがわかった。Form C は、相対湿度に応じて Form C から無水物結晶のエタノール和物である Form C-1 (CS-023·EtOH) に可逆的に変化した。そのため、80 °C における多形は、Form C-1 であると考えられた。エタノールは水より蒸発しやすいが、CS-023 の結晶中では水が先に脱離し、エタノールは沸点を超えても速やかな脱離が生じないことがわかった。

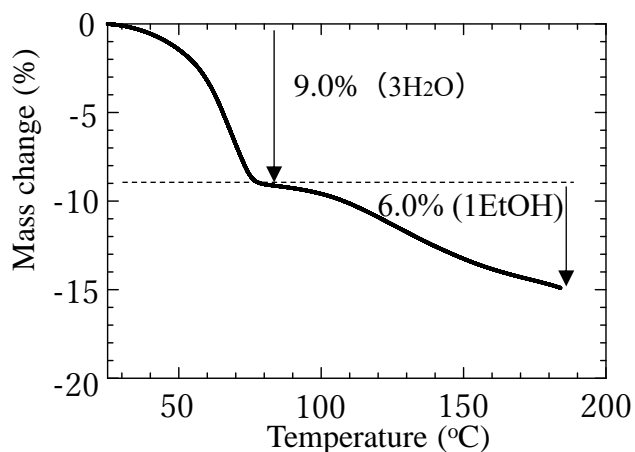


Figure 4-1 Thermogravimetric (TG) diagrams of Form C

さらに、転移に伴う吸熱量および発熱量を知るために DSC の測定を行った。Form C を 25 °C から 180 °C まで加熱した後、冷却した際の熱量変化を Figure 4-2 に示す。2 段階の熱量変化が見られ、25 °C から 90 °C で結晶 1 mg 当たり 252 mJ の吸熱を示し、90 °C から 180 °C で 29 mJ の吸熱を示した。25 °C から 90 °C の範囲の熱量変化は、水の脱離に伴う吸熱と構造転移に伴う吸熱あるいは発熱が考えられる。Form C の結晶 1 mg に含まれる水の量は 0.09 mg であるため、水の蒸発エンタルピー 2257 mJ/mg (25 °C) を用いて、水の蒸発エンタルピーとして計算すると、205 mJ (25 °C) に相当する。そのため、液体の水が蒸発する場合とほぼ等しい熱量変化をしている。また、90 °C から 180 °C の範囲の熱量変化も水と同様に、エタノールの脱離に伴う吸熱と構造転移に伴う吸熱あるいは発熱が考えられる。Form C の結晶 1 mg に含まれるエタノールは 0.07 mg であるため、エタノールの蒸発エンタルピー 839 mJ/mg を用いて、エタノールの蒸発エンタルピーとして計算すると、59 mJ に相当し、エタノールの蒸発潜熱の約半分に対応することがわかった。

一方、冷却時は、120 °C から 110 °C に冷却する間で発熱が観測された。DSC 測定は窒素雰囲気下で行っているため、冷却中に CS-023 に吸着する溶媒分子はない。そのた

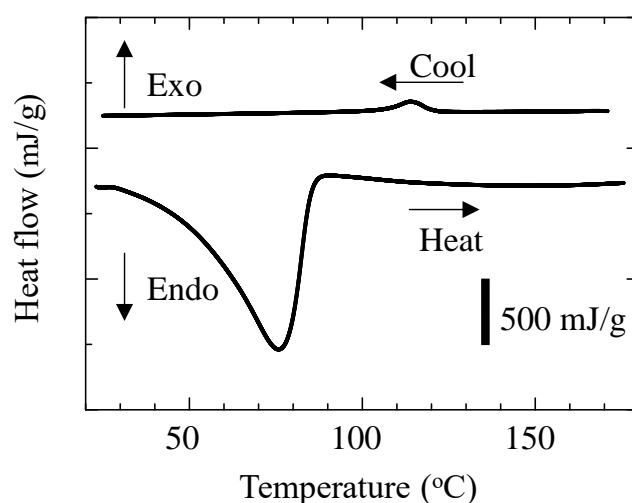


Figure 4-2 Differential scanning calorimetry (DSC) diagrams of Form C

め、この区間の発熱は結晶構造の変化によるものと考えられた。これら熱量は、固相転移させるために結晶に与える必要のあるエネルギーであり、固相転移を利用したスケールアップ時に伝熱を考えた運転条件を決定するために重要である。

次に、様々な温度で XRD による測定を行い、結晶構造がどのように変化するのか調べた。Form C を 25 °C から 180 °C まで窒素雰囲気下で加熱して 180 °C に到達後、25 °C まで冷却した。Figure 4-3(a) に、25 °C における Form C を示した。昇温中の 80 °C、180 °C ではそれぞれ Figure 4-3(b)、(c) の回折パターンを示した。80 °C で Form C-1 に転移していたが、180 °C では未知の回折パターンを示したため Form C-2 (CS-023・無溶媒和物) と名付けた。180 °C から 25 °C に冷却後の回折パターンは(d) となり、Form H-1 と同じ回折パターンを示した。DSC で 110 °C から 120 °C の変化は、Form C-2 から Form H-1 であったと考えられる。図には示していないが、Form H-1 を加熱すると、110 °C から 120 °C にかけて吸熱を示し、Form C-2 に固相転移した。以上のように熱分析で得られた変化がすべて多形転移で説明できることがわかった。さらに、2.3.1 項で述べたように、Form H-1 と同じパターンであれば、30 %RH 以上に湿度調整すると転移するはずで

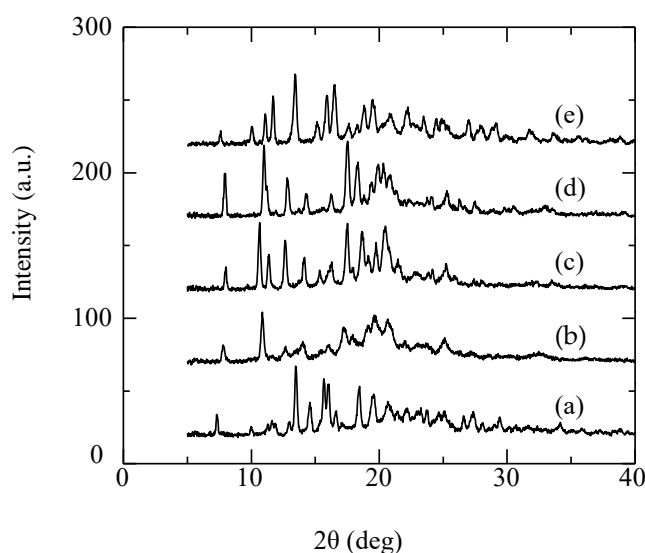


Figure 4-3 The XRD patterns at various temperatures and humidities: (a) Form C at 25 °C, (b) at 80 °C, (c) at 180 °C, (d) cooled to 25 °C, (e) at 25 °C, 80 %RH

ある。そこで、80 %RH に湿度調整して測定したところ、(e)に示すように、Form H と同じパターンが得られた。

次に、様々な温度で偏光顕微鏡による形態の観察を行った。XRD 測定と同様に 25 °C から窒素雰囲気下で加熱して 180 °C に到達後、25 °C に冷却した。Figure 4-4(a)、(b)、(c)は、それぞれ、25 °C、80 °C、180 °C の写真であり、(d)は 180 °C から 25 °C に冷却して得られた結晶の写真である。(a)から(b)への昇温中に結晶に細かくひびが入っていくことが観察された。そして、偏光色は、(010) 面、(100) 面から (001) 面の中心に向かい変化することが観察された。これは、(010) 面や (100) 面から水が脱離し、

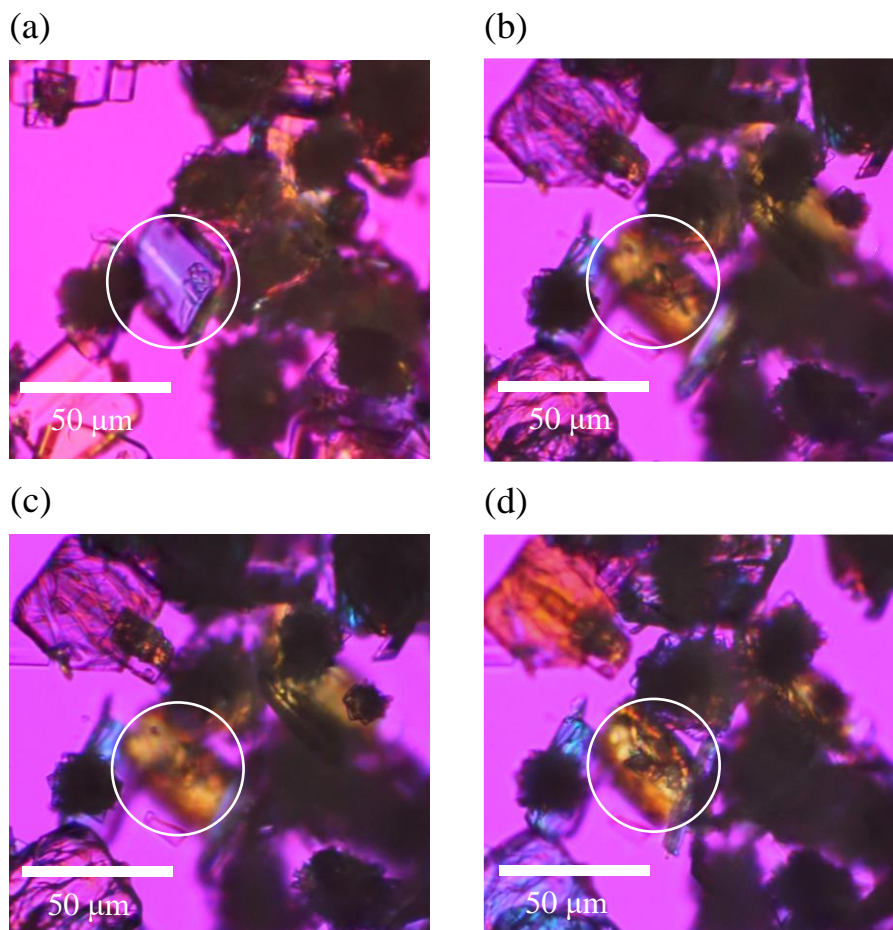


Figure 4-4 The polarized microphotographs during heating and cooling: (a) Form C at 25 °C, (b) at 80 °C, (c) at 170 °C, (d) at 25 °C, 0 %RH

構造が変化したためと考えられる。(a)と(d)を比べると偏光色が異なっており、Form Cが元の形態に戻っていないことがわかった。

以上のことから、Form Cの固相転移は、Figure 4-5に示した経路で変化することが明らかとなった。

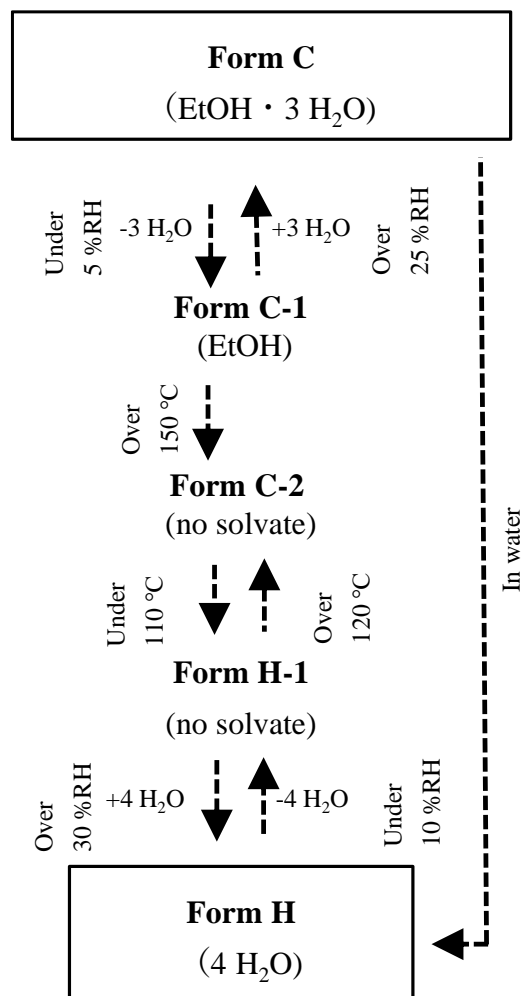


Figure 4-5 Diagram of the solid-phase transformation of Form C to Form H

4.3.2 CS-023 の多形相関図

第 2 章では、水溶液中で Form H (CS-023·4H₂O) が取得され、相対湿度に応じて Form H-1 (CS-023·無水物) に可逆的に固相転移することを示した。80 v/v%エタノール水溶液からは Form A (CS-023·5/2EtOH·1/2H₂O) が取得され、25 °C、エタノール蒸気圧に応じて Form A-1 (CS-023·1/2EtOH·1/2H₂O) に可逆的に固相転移した。Form A-1 は、170 °Cでエタノールと水が脱離し、Form A-2 (CS-023·無溶媒和物) に固相転移した。そして、25 °Cに冷却しても多形の変化はなかった。Form A-2 は水の 25 °C、80 %RH 以下の相対湿度に応じて、Form B と可逆的に固相転移した。そして、25 °C、80 %RH 以上の相対湿度で Form H に固相転移した。

第 3 章では、20 v/v%から 70 v/v%のエタノール組成の水溶液で Form C (CS-023·EtOH·3H₂O) が取得された。Form C は 25 °Cにおいて相対湿度に応じて Form C-1 (CS-023·EtOH) と可逆的に固相転移した。また、40 v/v%から 90 v/v%のエタノール組成の水溶液では、Form C が Form A に対して安定晶であり、溶媒媒介転移して Form C に転移した。

本章では、Form C-1 を 150 °Cに加熱するとエタノールが脱離し、Form C-2 (CS-023·無溶媒和物) が得られた。そして冷却すると、120 °Cから 110 °Cにかけて Form H-1 に固相転移した。Form H-1 を加熱すると、110 °Cから 120 °Cにかけて Form C-2 に可逆的に固相転移した。

これまでに明らかになった多形の相関関係を Figure 4-6 にまとめた。

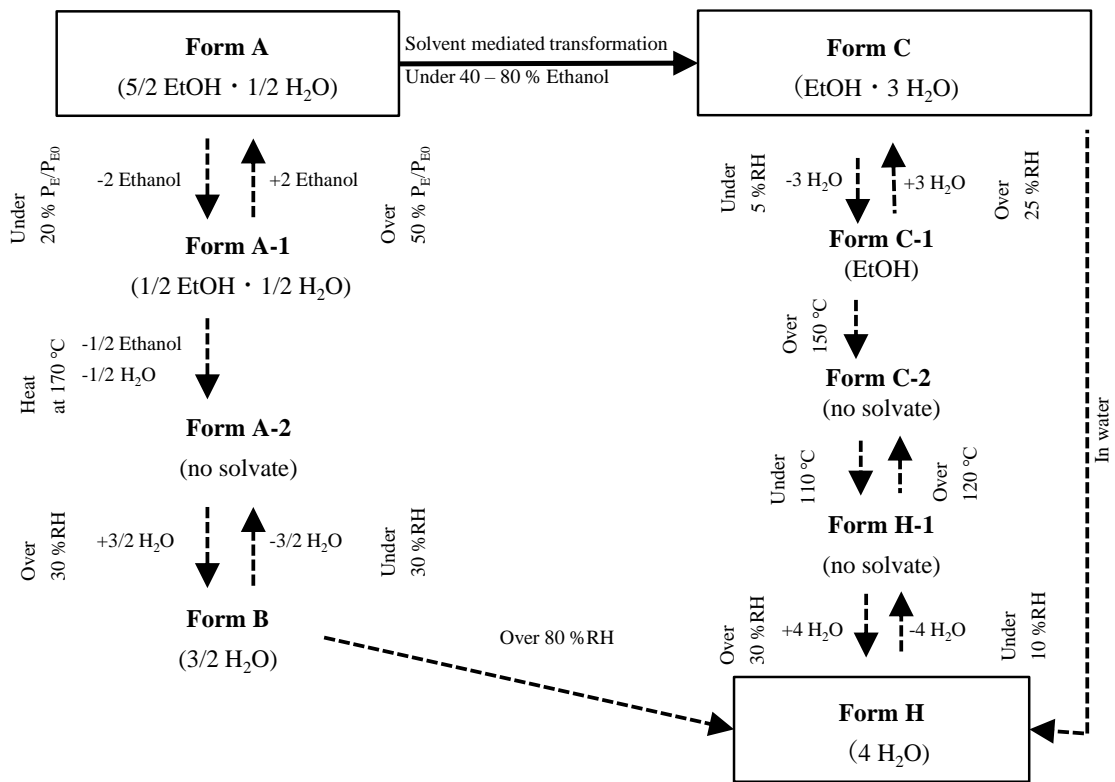


Figure 4-6 The solid-phase transformation map of CS-023 crystal polymorphs

4.3.3 Form A、Form C、Form H の結晶構造の比較

単結晶の構造解析に成功した多形の結晶学的データを Table 4-1 に示した。Form A の晶系は三斜晶系 (triclinic) であり、Form H および Form C は直方晶系 (orthorhombic) であった。Form A の空間群は P1 であり、Form H および Form C は P2₁2₁2₁ であった。Form A は Z=2 であり、単位格子中に 2 つの分子が存在する。5/2 エタノール 1/2 水和物としたが、単位格子にはエタノールが 5 分子、水 1 分子が存在する。

Table 4-1 Crystallographic data on Form A, Form H and Form C

Polymorph	Form A	Form H	Form C
Solvate	5/2Ethanol 1/2H ₂ O	4H ₂ O	EtOH 3H ₂ O
Crystal system	triclinic	orthorhombic	orthorhombic
Space group	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions			
a (Å)	10.23	9.879	9.857
b (Å)	13.21	13.322	13.1136
c (Å)	14.04	23.45	24.1859
α (°)	78.07	90	90
β (°)	89.02	90	90
γ (°)	76.63	90	90
Volume (Å ³)	1805.1	3086	3113.2
Z	2	4	4
Density (calculated)	1.125 g/cm ³	1.351 g/cm ³	1.361 g/cm ³

Form A、Form H、Form C の充填構造は、CS-023 分子の螺旋鎖で構成されている。その螺旋構造を簡単に説明するために、CS-023 分子のグアニジル基側を Head、β-ラクタム構造側を Tail とし、結晶構造中で水素結合するカルボニルの酸素原子に対して番号をつけた (Figure 4-7)。Figure 4-8(a) は、Form A を単位格子中の ab 平面から見た図 (上段) と、bc 平面から見た図 (下段) を示しており、Figure 4-8(b)、(c) はそれぞれ Form H、Form C を ac 平面から見た図 (上段) と bc 平面から見た図 (下段) を示して

いる。水素原子は構造を単純化するために記載を省いた。2つの螺旋鎖の関係は隣り合う螺旋鎖の関係を示している。螺旋鎖の向きは、Figure 4-8(a)の Form A の bc 平面では、螺旋鎖の上部を Head、下部を Tail として4分子が並んでおり、水素結合によって Head-Tail-Head-Tail で形成されている。この図では、螺旋鎖が bc 平面で Tail から Head に向けた方向は、ab 平面では左回りとして描かれている。Form A、Form H、Form C の各螺旋鎖の構造は、分子のコンフォメーションはわずかに異なるものの似ていることがわかった。

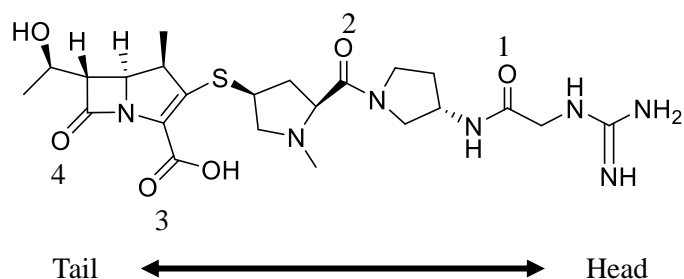


Figure 4-7 The carbonyl groups forming the hydrogen bonding numbered 1 to 4 and the corresponding directions in a molecule named as "Head" and "Tail" for a helical chain

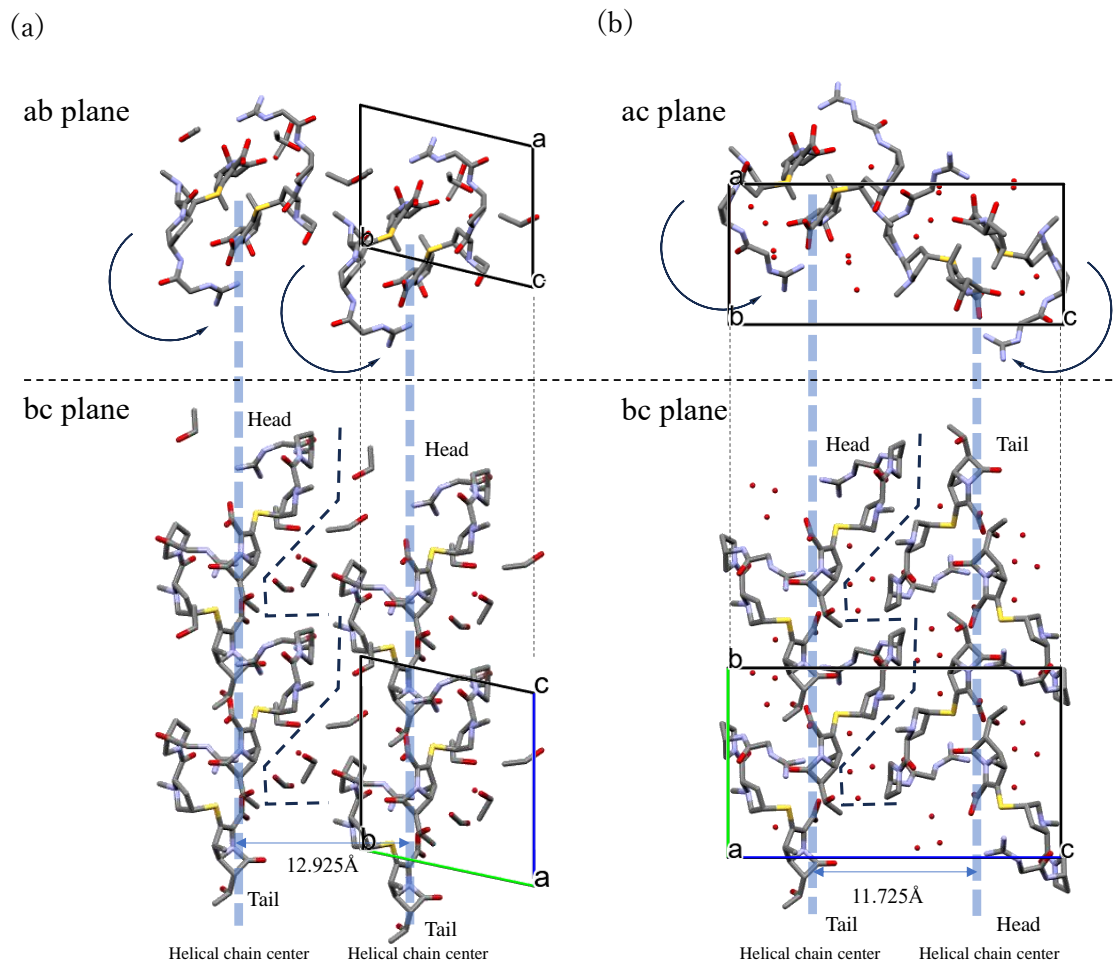


Figure 4-8 Helical chain structure (a) Form A, (b) Form H

Element color: black (Carbon), red (Oxygen), blue (Nitrogen), yellow (Sulfur)

(c)

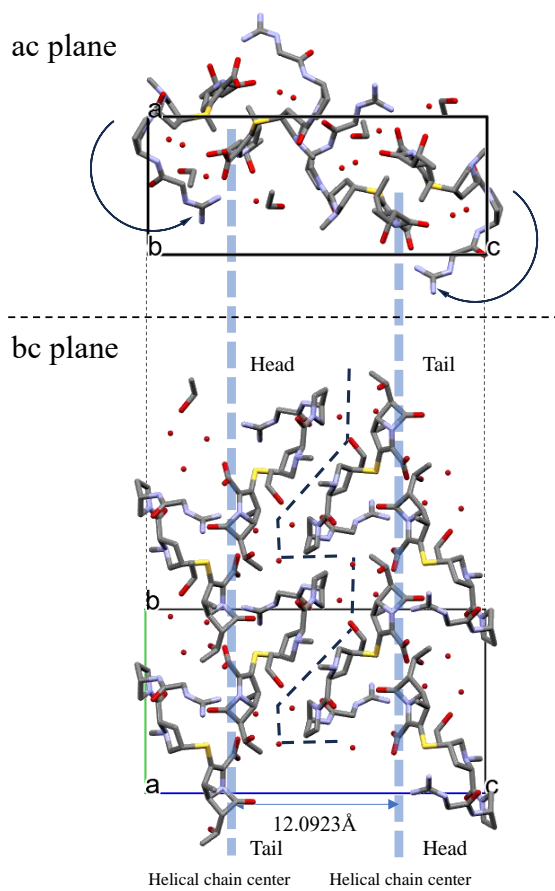


Figure 4-8(Continued) (c) Form C

Element color: black (Carbon), red (Oxygen), blue (Nitrogen), yellow (Sulfur)

4.3.4 Form C から Form H への固相転移

Form C から Form H への固相転移の説明を試みた。溶媒和を除いた Form C と Form H は、螺旋構造だけでなく分子のコンフォメーションも非常に類似している。構造の類似性から、Form C から Form H の固相転移は溶媒が入れ替わることだけで可能であると考えられ、Form C は、Form H への固相転移が容易である可能性を示唆している。しかしながら、Form C から Form H への固相転移では、水が脱離した後、エタノールの脱離が必要で、その後水の吸収が必要である。そのメカニズムについて考察した。

まず、結晶構造中の CS-023 分子は、Figure 4-9 に示したように、(001) 面に平行である b 軸の向きで螺旋鎖が並んでいる。図中の (002) 面は、単位格子中で c 軸方向に隣り合う螺旋鎖の対称中心である。水及びエタノールは、この螺旋鎖を形成する CS-023 分子の隙間を埋めるように充填されている。

次に、電子密度を様々に変えて等価面を描いた構造 (Void) を Figure 4-10 に示した。電子密度が低いほどより真空に近い状態で、最も電子密度が低い場所はエタノールが

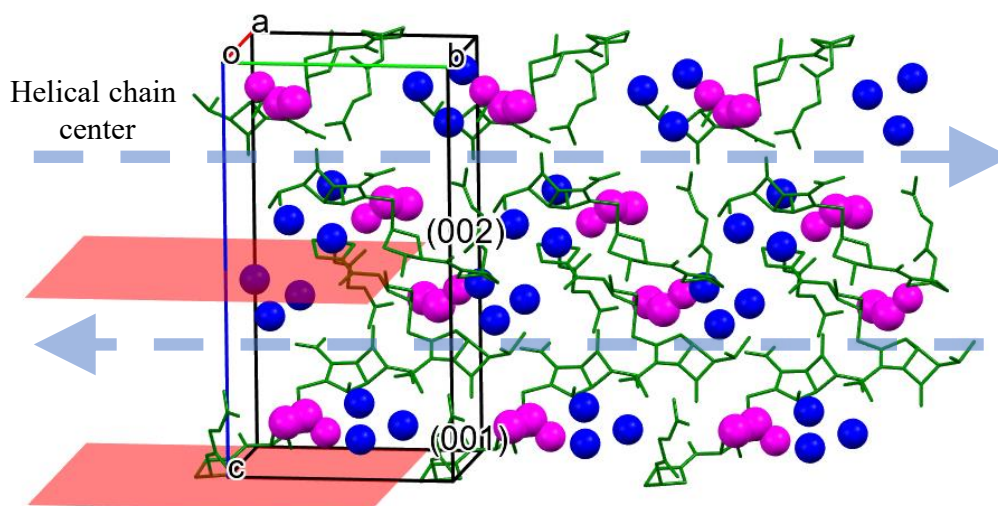


Figure 4-9 Miller indices corresponding to the helical structure of Form C. Red: (001) plane, Green (CS-023), Purple (Ethanol), Blue (Water)

充填されていた場所であった (Figure 4-10(a))。MOPAC による水とエタノールの分子体積は、それぞれ 19 \AA^3 、 54 \AA^3 であった。そして、(b)に示した 0.0001 e au^{-3} では、エタノールと水の分子体積に近い 163 \AA^3 の空間が現れた。エタノールが脱離するためには、水が脱離するよりもより大きい断面積の経路が必要であると考えられる。さらに電子密度を高くしていくと、b 軸方向に連続した等価面の経路が現れた(c)。そのため、水およびエタノールの分子は主に螺旋鎖を形成する b 軸の向きの経路で結晶外部に脱離していると考えられた。(001) 面は、その経路の中心にあることから、構造として弱くなっている可能性がある。

そして、Form C を 0%RH 環境に静置し、Form C-1 としての SEM 像を Figure 4-11 に示した。Form C-1 の (001) 面に平行な面で結晶が層状に亀裂が入っている。亀裂の間隔である層の厚さは約 300 nm であり、これは約 250 本の螺旋鎖に相当する。これは、結晶外部の相対湿度を下げていくと結晶内部の水の分子運動に耐えられなくなり内圧が

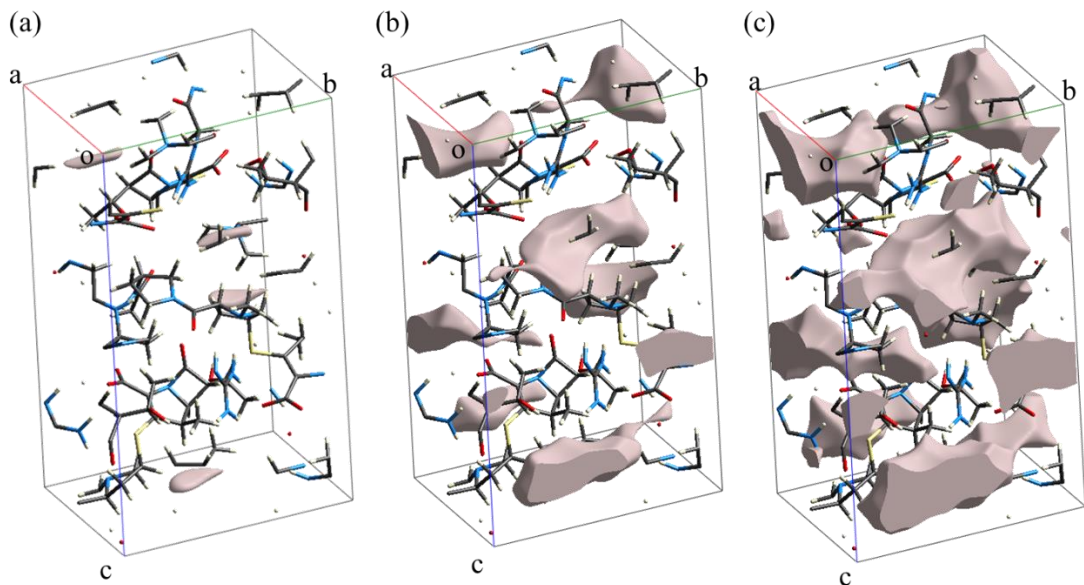


Figure 4-10 The electron density isosurfaces of the Form C structure, excluding ethanol and water, calculated at isovalue levels of $7.5 \times 10^{-6} \text{ e au}^{-3}$ (a), 0.0001 e au^{-3} (b), 0.0005 e au^{-3} (c)

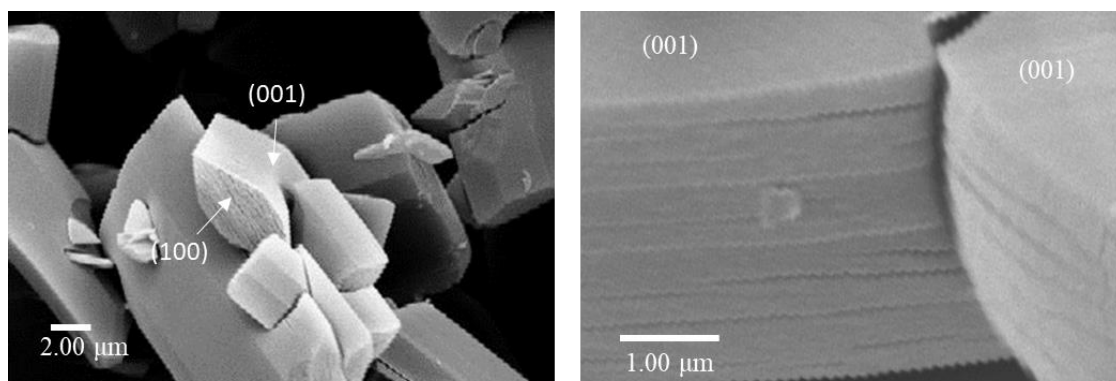


Figure 4-11 SEM image of Form C-1

高くなるために生じたものと推察される。そして、その亀裂を通して結晶外部に水が脱離したと考えられる。

一方、水溶液中では Form C から Form H への固相転移は、顕微ラマン分光分析から (011) 面および (010) 面から結晶内部に向かってエタノールと水の置換が生じていた (3.3.4 項を参照)。これは、螺旋鎖の方向である b 軸方向に相当している。このことから、 b 軸方向にエタノールと水が入り出す経路があると考えられる。以上のことから、Form C から Form H への転移では、主に b 軸に沿って溶媒分子が移動していると考えられる。そして、結晶中の溶媒分子の脱離と吸収について、以下の説明を試みた。Form C から Form C-1 への転移では、 b 軸方向に沿って水が脱離する。そして、高温条件で CS-023 の分子運動が活発になり隙間が広がると、Form C-1 から水より体積の大きいエタノールが脱離し、Form C-2 への転移が生じる。水とエタノールが脱離するが、構造が保たれている状態が Form C-2 である。そして、高温から低温になると、高温で広がった空間を埋めるように分子のコンフォメーションが変化し、安定な構造である Form H-1 になる。Form H-1 から Form H への転移では、水分子が容易に吸収し、CS-023 分子と水素結合を形成する。そして、この転移中は CS-023 分子の螺旋鎖は大きく変化をしていない。

4.3.5 Form A から Form H への固相転移

Form A と Form H の構造は大きく異なっており、Form A がどのように Form H に変換されるのかについて、固相転移のメカニズムの説明を試みた。

Figure 4-12 は、3つの多形の9個(3×3)の螺旋鎖(A-, B-, C-チェーンと名づけた)間の相互関係を示している。(a)はForm A、(b)はForm C、(c)はForm Hである。

3つの多形の構造を簡単に比較するために、水素原子、溶媒分子、すなわち水とエタノールは省いた。Form A は ab 平面、Form C および Form H は、ac 平面を示している。説明のために、各螺旋鎖中の各分子に1~6の数字を割り当てた。

Form A では、c 軸方向に螺旋が形成されており、A 鎖、B 鎖、C 鎖の繰り返し構造の並びは、螺旋鎖は同じ方向を向いている。すなわち、3本が並べられた螺旋鎖はすべて同じ向きで左回りである。一方、Form C と Form H では、b 軸方向に螺旋鎖が形成されており、A 鎖、B 鎖、C 鎖の繰り返し構造では、A 鎖と C 鎖が同じ向きであるが、B 鎖が逆向きとなっており、A→B→C の順で螺旋鎖の方向は交互に逆転している。すなわち、Form A の隣接する螺旋鎖間の相互関係は、Form C 及び Form H とは異なっている。

Form A から Form H には、Figure 4-12(a)の Form A の隣接する螺旋鎖間の相互関係から、Figure 4-12(c)の Form H の螺旋鎖の相互関係に変化しなければならないことを示している。Form A の B-1 と B-6 に着目した (Figure 4-13(a))。2つの分子は、それぞれ A-3 と C-3 の近傍にある水分子と水素結合している。そして、その水素結合を軸に、B-1 と B-6 を 180° 回転させると Figure 4-13(b)のようになった。この構造は、Figure 4-13(c)に示した Form H の構造と類似している。Form A の回転した B-1 と B-6 分子は Form H の B-3 と B-4 分子に相当する (Figure 4-12(c))。したがって、B 鎖の分子の回転により、Form H が形成可能であることがわかった。

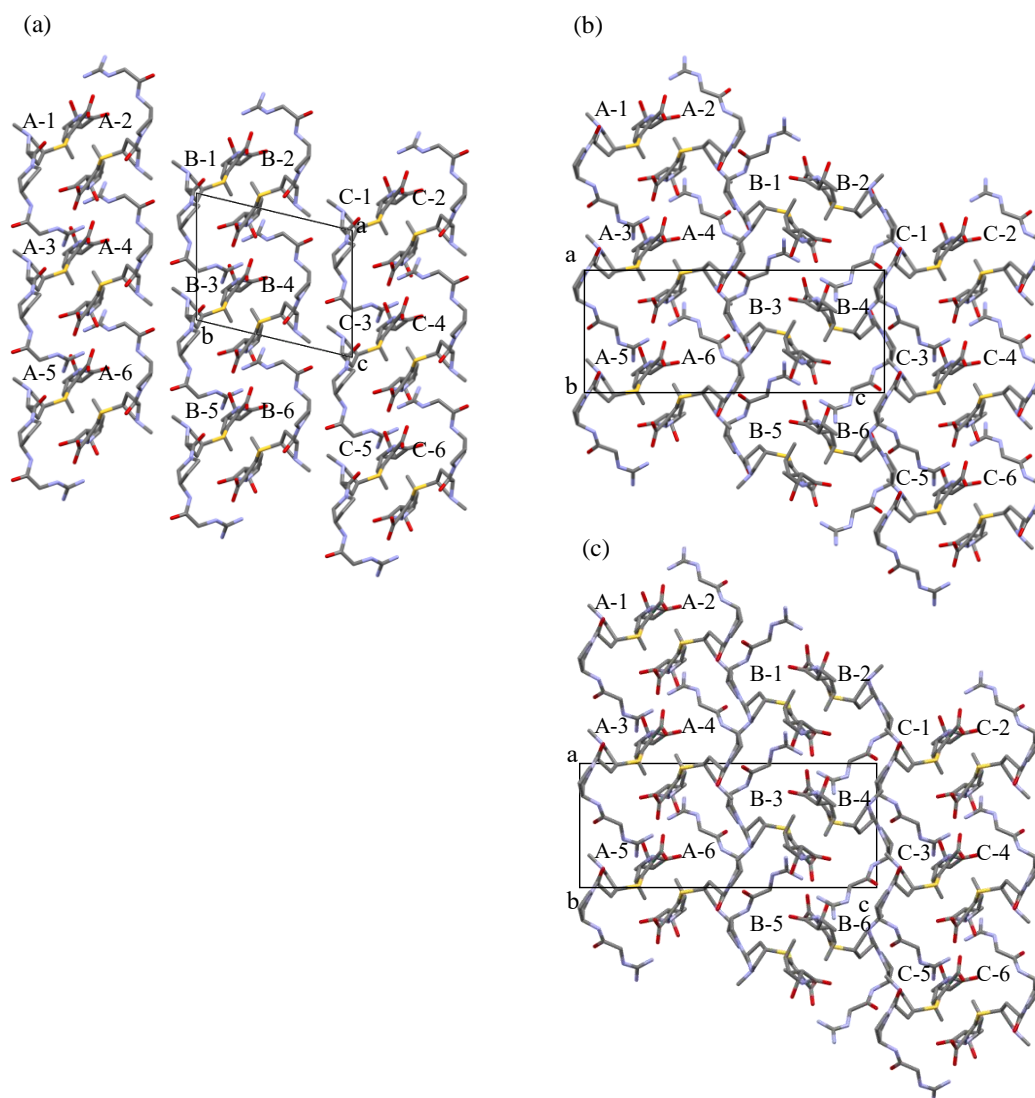


Figure 4-12 The comparison of the three-helix chain's mutual relationships observed in (a) Form A, (b) Form C, and (c) Form H, where the crystal solvents (ethanol and water) are omitted. The expansion ratios of the three lattices are same

次に、Form A の構造では 180° 回転する空間はないため、分子の回転が固体結晶中でどのように始まるのか説明を試みた。Figure 2-22 (2.3.4 項) では、Form A-2 (無水無溶媒) が水を吸収し、Form B を経由して Form H に転移することを示した。ここで注目することは、高い湿度において水を 7.4 等量まで吸収していたことである。Form B は、Form H の水和物のレベルを超え、過剰な水を吸収していた。この過剰に吸収した水と

CS-023 分子が水素結合して、螺旋鎖間にゆるみを引き起こし、Figure 4-13 のような分子の回転が可能になったと考えられる。

Figure 2-20 (2.3.4 項) の Form A-2 の低湿度環境で吸着する 0.5 等量の水は、螺旋鎖 2 つに対して 1 つの結合であることに合致しており、他の水とは異なる働きをしていることが示唆される。この水が CS-023 分子のカルボニル基 (Figure 4-7 の 1 の酸素原子) と水素結合して回転軸として機能し、Form H への転移に重要な役割を果たしていると考えられる。

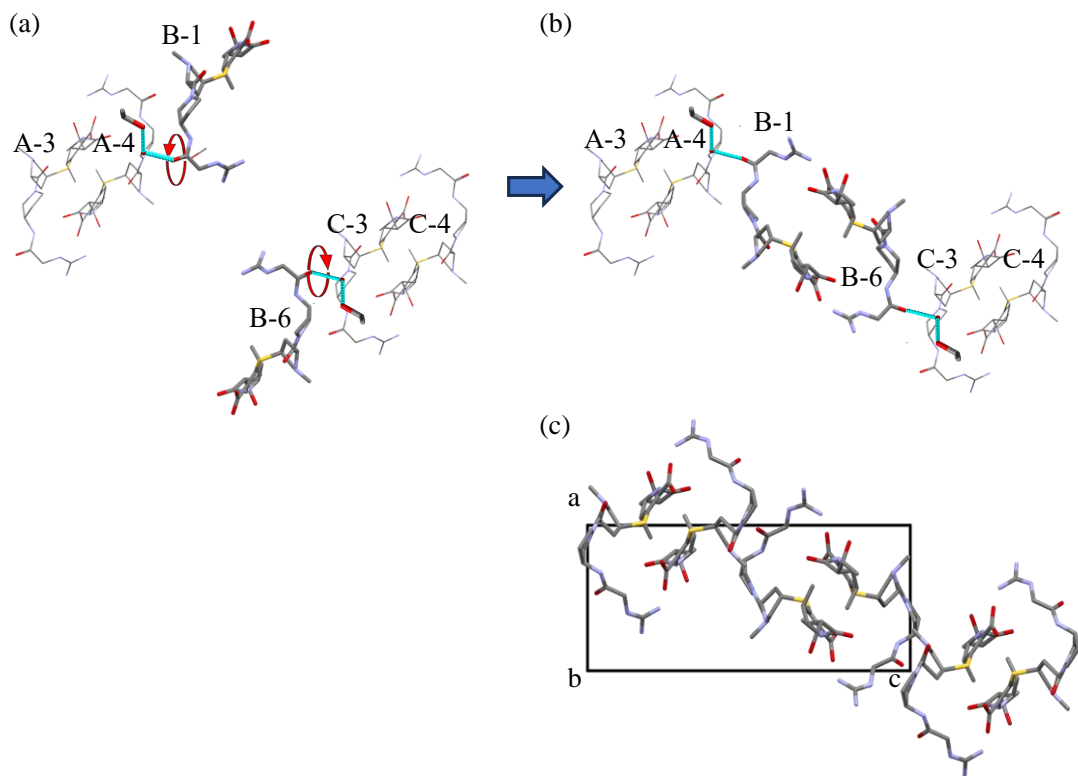


Figure 4-13 A possible mechanism of the solid-phase transition of Form A into Form H. The rotation of two CS-023 molecules (B-1 and B-6) in Form A results in the formation of a similar structure with Form H: (a) The B-1 and B-6 molecules shown in Figure 4-9. (a), (b) the relationship between the B-1 and B-6 molecules after those rotation, and (c) the mutual relationship between the three helix chains in Form H represented as a reference of Figure 4-12

4.4 結言

Form C (CS-023·EtOH·3H₂O) から Form H (CS-023·4H₂O) への固相転移をおこなった。最初に、Form C を 5 %RH 以下の条件下に置くことで、Form C-1 (CS-023·EtOH) が得られた。次に、Form C-1 を 150～180 °C に加熱することで、溶媒を持たない多形である Form C-2 が得られた。Form C-2 は 110 °C まで冷却することで Form H-1 に変化した。最後に、Form H-1 は 2 章で説明したように Form H に変化した。その結果、Form C を水溶液にせず、CS-023 の β-ラクタム構造の加水分解のリスクを伴わずに、水和物結晶を回収することができる。多形を変化させる方法として固相転移を採用することが好都合であった。

2 つの溶媒和物結晶である Form A と Form C が同じ水和物結晶に変換されることがわかった。3 つの多形、Form A、H、C はそれぞれ螺旋鎖構造で構成されていた。Form C と Form H は構造が非常に似ており、エタノールと水の置換によって固相転移が完了する。一方、Form A は同じ方向の螺旋鎖で構成されたが、Form C と Form H は、螺旋鎖の向きが一行置きに反転していた。Form A から Form H への固相転移は、固体中での螺旋鎖の組み換えが必要であった。CS-023 分子が水分子との水素結合を軸に回転すると Form H に転移可能であった。Form B が過剰に水を吸着し、その水が螺旋鎖の変化に重要な役割を果たすと考えられる。

引用文献

- 1) Cardew, P. T., Davey, R. J., The kinetics of solvent-mediated phase transformations. *Proc. R. Soc. A: Math. Phys. Eng. Sci.*, **398**, 415-428, 1985.
- 2) Gu, C. H., Young Jr, V., Grant, D. J., Polymorph screening: Influence of solvents on the rate of solvent-mediated polymorphic transformation., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1878-1890, 2001.
- 3) Abramov, Y. A., Loschen, C., Klamt, A., Rational coformer or solvent selection for pharmaceutical cocrystallization or desolvation., *J. Pharm. Sci.*, **101**, 3687-3697, 2012.
- 4) Bērziņš, A., Trimdale-Deksne, A., Belyakov, S., ter Horst, J. H., Switching Nitrofurantoin Polymorphic Outcome in Solvent-Mediated Phase Transformation and Crystallization Using Solvent and Additives., *Cryst. Growth Des.*, **23**, 5469-5476, 2023.
- 5) Roy, S., Bhatt, P. M., Nangia, A., Kruger, G. J., Stable polymorph of venlafaxine hydrochloride by solid-to-solid phase transition at high temperature., *Cryst. Growth Des.*, **7**, 476-480, 2007.
- 6) Long, S., Zhang, M., Zhou, P., Yu, F., Parkin, S., Li, T., Tautomeric polymorphism of 4-hydroxy nicotinic acid., *Cryst. Growth Des.*, **16**, 2573-2580, 2016.
- 7) Shi, G., Li, S., Shi, P., Gong, J., Zhang, M., Tang, W., Distinct pathways of solid-to-solid phase transitions induced by defects: the case of dl-methionine., *IUCrJ*, **8**, 584-594, 2021.
- 8) Zhang, Z., Suzuki, M., Yang, Y., Yoshikawa, I., Yin, Q., Houjou, H., Seed-triggered solid-to-solid transformation between color polymorphs: striking differences between quasi-isomorphous crystals of dichloro-substituted salicylideneaniline regioisomers., *CrystEngComm*, **22**, 4903-4913, 2020.
- 9) Li, M., Yue, Z., Chen, Y., Tong, H., Tanaka, H., Tan, P., Revealing thermally-activated nucleation pathways of diffusionless solid-to-solid transition., *Nat. Commun.*, **12**, 4042, 2021.
- 10) Patyk-Kaźmierczak, E., Kaźmierczak, M., Hydrate vs anhydrate under a pressure-(De)stabilizing effect of the presence of water in solid forms of sulfamethoxazole., *Cryst. Growth Des.*, **21**, 6879-6888, 2021.
- 11) Kitagawa, D., Kawasaki, K., Tanaka, R., Kobatake, S., Mechanical behavior of molecular crystals induced by a combination of photochromic reaction and reversible single-crystal-to-single-crystal phase transition., *Chem. Mater.*, **29**, 7524-7532, 2017.
- 12) Hariharan, P. S., Pan, C., Karthikeyan, S., Xie, D., Shinohara, A., Yang, C., Wang, L., Anthony, S. P., Solvent vapor induced rare single-crystal-to-single-crystal transformation of stimuli-responsive fluorophore: Solid state fluorescence tuning, switching and role of molecular conformation and substituents., *Dyes Pigm.*, **174**, 108067, 2020.
- 13) Rietveld, I. B., Solid-solid phase transitions between crystalline polymorphs of organic

materials., *Curr. Pharm. Des.* **29**, 445-461, 2023.

- 14) Allen, F. H., Johnson, O., Shields, G. P., Smith, B. R., Towler, M., CIF applications. XV. enCIFer: a program for viewing, editing and visualizing CIFs. *J. Appl. Crystallogr.*, **37**, 335-338, 2004.
- 15) Spackman, P. R., Turner, M. J., McKinnon, J. J., Wolff, S. K., Grimwood, D. J., Jayatilaka, D., Spackman, M. A., CrystalExplorer: A program for Hirshfeld surface analysis, visualization and quantitative analysis of molecular crystals. *J. Appl. Crystallogr.*, **54**, 1006-1011, 2021.

第5章 結論

医薬品原薬の多くは結晶の形態で開発される。様々な結晶特性の中で多形は薬効や安定性に影響を及ぼすため、その制御は特に重要な課題である。本論文では、核形成、結晶成長、固相転移の基本概念と理論的背景を基に、 β -ラクタム構造を持つカルバペネム系抗生物質 CS-023 をモデル化合物として晶析操作と多形の関係について検討した結果をまとめた。

第 2 章では、まず水溶液からの冷却晶析による水和物結晶の取得を試みた。その結果、4 水和物結晶 (Form H) を得た。Form H は医薬品として適していると考えられた。しかし、水に溶解した CS-023 の加水分解が著しいことがわかった。そこで、Form H を安定的に製造する晶析法について検討した。80 v/v%エタノールを用いた貧溶媒晶析を試みた結果、新たな溶媒和物結晶、5/2 エタノール 1/2 水和物結晶 (Form A) が得られ、固相転移させることにより、Form H を製造することに成功した。

第 3 章では、Form A の安定的な製造が保証されるエタノール組成の範囲を決定するために、70 v/v%以下のエタノール組成で貧溶媒晶析を試みた。しかし、洗浄と乾燥を通して得られた結晶は、エタノールと水による溶媒和組成を特定できないという問題があった。そこで、洗浄および乾燥を行わないで、晶析溶媒に浸漬したままの単結晶について X 線回折分析による結晶構造の決定を試みた。その結果、70 v/v%以下のエタノール溶媒下で析出した結晶は Form A と異なる 1 エタノール 3 水和物結晶 (Form C) であることがわかった。一方で、Form A はエタノール水溶液中で準安定晶であり、安定的な製造が保証されるエタノール組成の範囲が狭いことが明らかとなった。安定な Form C を取得するために、水溶液中で多形の変化を調べたところ、CS-023 の加水分解は避けられないものの Form C は水溶液中で徐々に Form H に変化することがわかった。次に、結晶洗浄溶媒組成と乾燥方法が多形に与える影響について詳細に検討し、Form C を確実に製造する方法を確立した。

第4章では、Form C から Form H を取得する方法を検討し、液相を介さない固相転移で Form C から Form H を取得することに成功した。この方法により、加水分解させずに Form H を得ることが出来た。加水分解しやすい化合物では、固相転移を積極的に利用した製造プロセスが有用であることを示した。さらに、第2章および第3章で得られた固相転移のメカニズムについて検討した。単結晶構造解析に成功した3つの多形、Form A、H、Cの結晶構造は、それぞれ螺旋鎖から構成されていた。ただし、Form Aは螺旋鎖を構成する分子が同じ向きに並んだ構造であるが、Form CとForm Hは構成分子が異なる向きに交互に並んだ構造であった。それら構造から Form C から Form H への転移は大きな構造変化がなくエタノールと水と置き換わることで完了できるが、Form A から Form H への転移は Form A の螺旋鎖の構成分子が一行置きに180度回転する大きな変化が必要であり、その分子の回転には水素結合が重要であると推察された。

以上のように、本研究では様々な分析手法を組み合わせることによって CS-023 の多様な溶媒和物結晶の多形を特定し、固相転移のメカニズムを分子レベルで説明することを試みた。本研究で用いた固相転移挙動を明らかにする方法は、汎用的に溶媒和物結晶の多形を特定する技術になることが期待される。そして、結晶構造から考察した転移メカニズムは、分子レベルでの固相転移を理解するための今後の研究につながると考えられる。

公表論文

第 2 章

Matsuura, S., Igarashi, K., Azuma, M., Ooshima, H., Polymorphic Crystallization Design to Prevent the Degradation of the β -Lactam Structure of a Carbapenem, *Crystals*, **11**(8), 931, 2021.

第 3 章

Matsuura, S., Igarashi, K., Azuma, M., Ooshima, H., The Identification and Characterization of a New Carbapenem CS-023 Solvate Polymorph Achieved by the Appropriate Crystal Washing and Drying, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **56**(1), 2215255, 2023.

第 4 章

Matsuura, S., Igarashi, K., Azuma, M., Ooshima, H., The Solid-Phase Transition of Carbapenem CS-023 Polymorphs and the Change in Helicity Observed in the Transition, *Crystals*, **14**(1), 71, 2024.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました大阪市立大学 大嶋寛 名誉教授、大阪公立大学大学院 工学研究科 東 雅之 教授、辻 幸一 教授、小嶋 誠也 教授、五十嵐 幸一 准教授に厚く御礼申し上げます。

このような機会と様々な面でご支援を賜りました第一三共薬株式会社プロセス技術研究所の中村 嘉孝 所長、旧プロセス技術研究所の小野田 俊彦 所長、池田 正弘 所長、貴志 直文 所長、宮寺 彰彦 所長、森本 潤グループ長、ならびに長谷川 玄グループ長に深く感謝いたします。また、研究成果の社外発表を後押しいただいた萩澤 稔 主任研究員、研究活動を理解し応援していただいた沼上 英治 上級研究員、大田 和宏 上級研究員、数々のご助言を頂いたおよび同僚各位に、この場をお借りして御礼申し上げます。

2023年9月 松浦 伸治