

《若手研究者紹介》



Cocrystal による物性改善およびその結晶構造解析

安 藤 茂* Shigeru Ando

塩野義製薬株式会社開発研究所

1. はじめに

筆者が高校生の時、漠然と将来は“化学者”になりたいと思い描いていた。それは、化学変化に伴い新たなモノを見出すことに憧れていたことであり、その神秘性に惹かれてのことであった。そして、大学進学にあたり“化け学”の中でも薬創りをしたいと思い地元千葉の千葉大学薬学部の門を叩いた。大学進学後も“化け学”への興味は尽きず、化学合成への道を進むものと本人も思っていた。しかし、それが一変したのは山本恵司教授の“製剤学”の講義であった。それまで、薬=主薬=主役で、その本体の創造にしか興味が無かった筆者であったが、山本恵司教授の講義で難水溶性薬物の可溶化により吸収改善を行い、主薬のポテンシャルを最大限に発揮させる“製剤学”との出会いで大きく進路が変わった。“溶けないモノを溶かす”という、簡単そうなことではあるが実に難解な課題であるにもかかわらず、“分子製剤学”という観点からそのメカニズムについてユニークに且つ嬉々として講義する山本教授に魅了されたのだ¹⁾。4年次進級時の研究室配属ではもちろん製剤工学研究室への配属を希望し、幸運にも同研究室へ配属が叶った。研究室では、山本恵司教授を始め、森部久仁一講師（現千葉大学・教授）、戸塚裕一助手（現大阪薬科大学・教授）の御指導の下、研究テーマとして与えられた計算化学による cocrystal 形成予測に取り組んだ。本研究では量子化学計算を用いて計算化学的な手法から cocrystal 形成メカニズムおよびその形成能を検討する内容であった。本研究での成果は思うようなものではなかったが、

この研究が現在の創薬基礎研究の礎となっていることは言うまでもない。

大学院修士課程を修了後は塩野義製薬株式会社に入社し、創薬初期からの原薬の物性評価およびその物性改善を主業務とした。上司の井田泰夫主幹研究員の方針で各人が通常の業務をこなすとともにそれにプラスして強みを身に付けることを課していたことから、大学院時代の研究テーマであった cocrystal に関する検討を社内でも実施し、原薬の物性改善技術の確立を目指した。さらに2010年から千葉大学大学院医学薬学府博士後期課程に入学させて頂く運びとなった。そこで再び製剤工学研究室に籍をおき、山本恵司教授、森部久仁一准教授、東頭二郎助教の先生方にお世話になることとなった。本稿では大学院後期博士課程在学時の研究内容を紹介させて頂きたい²⁾。

2. 背 景

医薬品開発において医薬品原薬の物理化学的特性改善の手法として、近年 cocrystal が注目を浴びてきている。Cocrystal は、2種以上の異なる分子がイオン結合ではなく、水素結合や π - π 結合のような非イオン性の分子間相互作用により規則的に配列した結晶として定義され、塩とは異なる物理化学的特性を有した結晶である。既に、cocrystal に関して多くの研究がなされており、溶解度や安定性の改善などの物理化学的特性改善例、スクリーニング方法の構築など多数報告されている。

今回、モデル薬物として用いたナプロキセンは、非ステロイド性抗炎症薬に分類される薬物であり難水溶性化合物であることが知られている。本研究では、coformer としてニコチンアミドを用いたナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal の物理化学的特性として固有溶解速度を評価し、その溶解改善効果を確認した。さらに各種固体 NMR 測定および単結晶

*2007年3月千葉大学大学院薬学研究科博士前期課程修了（製剤工学研究室）。同年4月塩野義製薬株式会社入社。2013年千葉大学より博士号（薬学）取得。研究モットー：やってみようからはじめよう、失敗の中にこそ宝あり。連絡先：〒561-0825 大阪府豊中市二葉町3-1-1 E-mail: shigeru.andou@shionogi.co.jp

X線構造解析による構造評価を行いその構造的特徴を議論した。

3. 固有溶解速度評価

ナプロキセン単独, ナプロキセンとニコチンアミドの物理的混合物 (PM) およびナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal の固有溶解速度を評価した。試験液には第 16 改正日本薬局方崩壊試験第 1 液を用いた。試験開始から 120 分後までの固有溶解速度は, ナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal が 25.0 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}^2$ を示した。これは, ナプロキセン単独の 8.9 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}^2$ に比べて 2.8 倍, PM の 14.3 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}^2$ に比べて 1.8 倍であった。このことから, ナプロキセンはニコチンアミドとの cocrystal を形成することに伴い溶解速度が改善されることが明らかとなり, cocrystal 化がナプロキセンの溶解改善に有効であると言える。

4. 固体 NMR 法による解析

ナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal の構造評価を行い, 結晶中での分子内および分子間相互作用の変化を評価した。Cocrystal に代表される複合体結晶の結晶構造を議論するためには, 単結晶 X 線構造解析が最も有効であるが, 単結晶を得ることが困難な場合がしばしば見られる。このような場合に複合体結晶の結晶構造を議論するためには, 結晶構造変化を分子レベルで解析を行うことが可能な装置を用いる必要があるが, これには固体 NMR 法が非常に有効な手法とされている。固体 NMR 法では原子核の化学シフトの解析から水素結合や局所的な環境の変化を解析することが可能である。特に, ^{13}C の化学シフトは 0~200 ppm と広い範囲で観察され, 結晶格子中の化学量論比, 非対称単位に存在する分子数といった結晶全体の構造情報, さらに結晶中での結合状態が大きく変化した部位周辺を推定するといった局所的な構造情報を得ることが可能であるため, 結晶の構造推定に広く用いられている。一方, 固体の ^1H の化学シフトは, 化学シフト範囲が 0~15 ppm 程度と狭い上にシグナルがブロードで分離度が低いためあまり利用されていなかった。しかし, 40 kHz 以上の高速回転での測定が可能となったことからピークが先鋭化され, 分子間相互作用の強さやプロトンの授受による分子のイオン化の有無

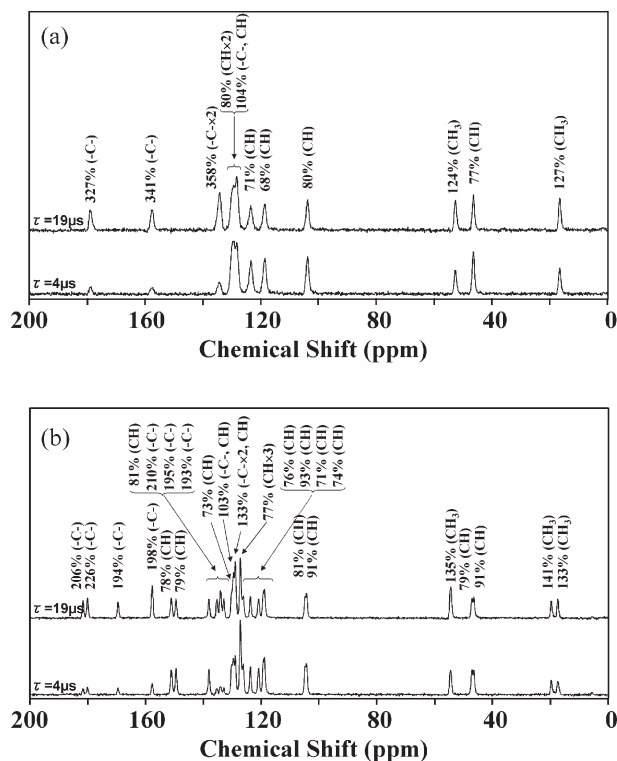


Fig. 1. Dipolar INEPT NMR spectra of (a) naproxen with $\tau = 19 \mu\text{s}$ and $4 \mu\text{s}$, and (b) naproxen-nicotinamide cocrystal with $\tau = 19 \mu\text{s}$ and $4 \mu\text{s}$. $I(19 \mu\text{s})/I(4 \mu\text{s})$ values are shown in (a) and (b). Spinning rate: 20 kHz, Recycle delay: 10 s, Contact time: 3 ms.

が議論されるようになった。また, 二次元固体 NMR 測定の一手法である ^1H - ^{13}C 交差分極 (CP)-異種核相関分光法 (HETCOR) NMR 測定は, 一次元固体 NMR 測定では捉えきれないより詳細な分子内および分子間相互作用の変化およびその部位の特定を解析することが可能である。

4.1 ^{13}C および ^1H シグナルの帰属

固体状態におけるナプロキセンおよびナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal 中の各 ^{13}C および ^1H シグナルを帰属するため, dipolar INEPT 測定および ^1H - ^{13}C CP-HETCOR NMR 測定を行った。Dipolar INEPT 測定は観測核に直接結合している磁気モーメントの大きい水素原子からの分極移動を利用して感度を向上させる手法である。本手法は炭素原子に結合している水素原子の数を同定するために用い, CH, CH_2 , CH_3 および $-\text{C}-$ は異なる 2 種の展開時間 (τ) での測定結果のシグナル強度比から判別することが可能であり, $\tau = 4$ および $19 \mu\text{s}$ での強度比 $I(19 \mu\text{s})/I(4 \mu\text{s})$ は CH, CH_2 , CH_3 および $-\text{C}-$ のそれぞれで 69%, 6%, 136% および 217~303% で

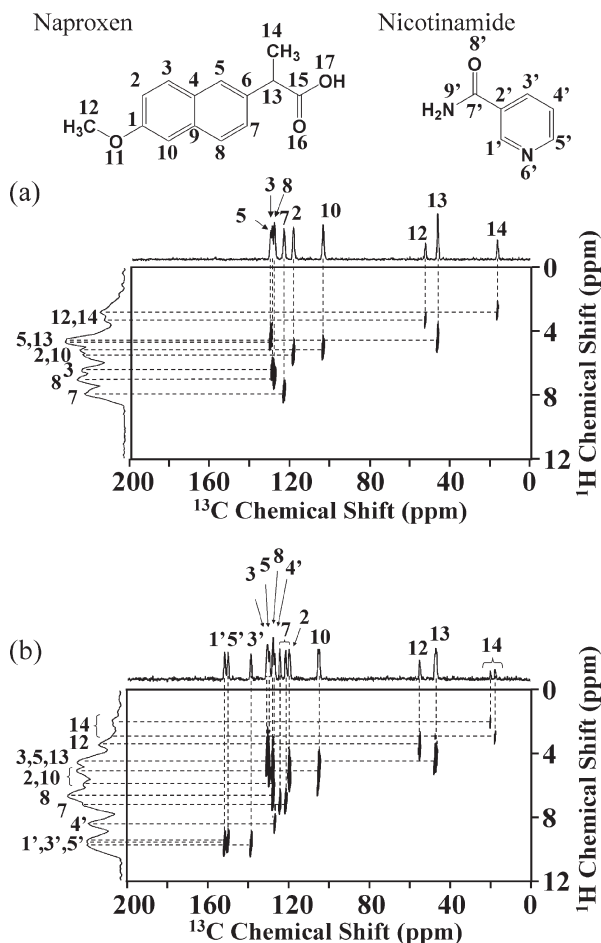


Fig. 2. ^1H - ^{13}C CP-HETCOR spectra of (a) naproxen and (b) naproxen-nicotinamide cocrystal. Spinning rate: 40 kHz, Recycle delay: 18 s, Contact time: 0.1 ms.

ある。本手法を用いて今回ナプロキセンおよびナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal の CH, CH_2 , CH_3 および $-\text{C}-$ の帰属を実施した (Fig. 1)。さらに HETCOR NMR 測定は分子内および分子間相互作用を研究する上では有用な手法であり、異種核の結合や相関を検討するために多くの研究に用いられている。接触時間 0.1 ms といった短い時間設定での ^1H - ^{13}C CP-HETCOR NMR 測定では、直接結合している ^1H - ^{13}C 相関のみを観測することが可能であり、先の dipolar INEPT 測定結果と併せて解析することによりナプロキセンの炭素原子および水素原子の 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14 を帰属した (Fig. 2 (a))。同様にナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal の炭素原子および水素原子の 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 1', 3', 4', 5' を帰属した (Fig. 2 (b))。また、接触時間 5 ms といった長い時間設定での ^1H - ^{13}C CP-HETCOR NMR 測定では、直接結

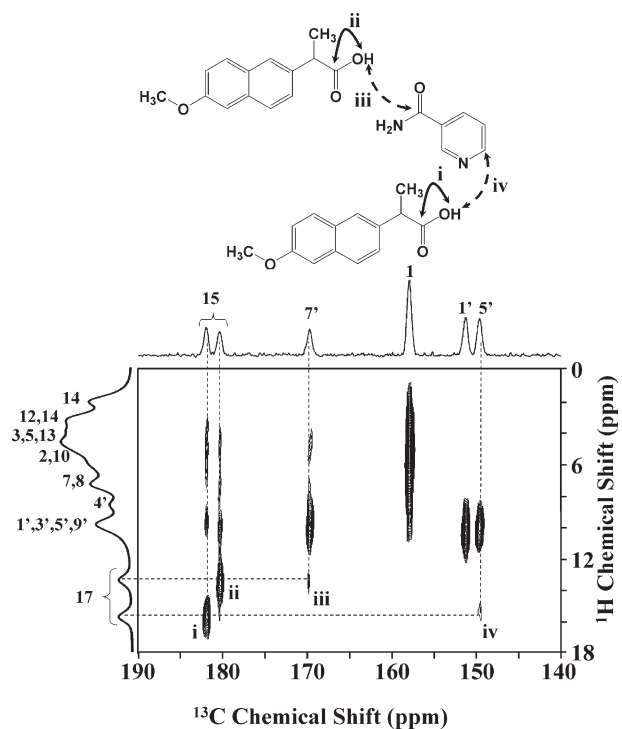


Fig. 3. ^1H - ^{13}C CP-HETCOR spectrum of naproxen-nicotinamide cocrystal. Spinning rate: 40 kHz, Recycle delay: 18 s, Contact time: 5 ms.

合している ^1H - ^{13}C 相関だけではなく空間的に近い距離の ^1H - ^{13}C 相関を観測可能であり、この結果より、ナプロキセンのカルボキシル基の C15 および H17 の帰属が可能であった (Fig. 3 i および ii)。以上の結果から、ナプロキセンおよびナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal の各 ^1H および ^{13}C シグナルの帰属を明らかとした。

4.2 ^{13}C CP/マジック角回転 (MAS) NMR 測定による解析

^{13}C CP/MAS NMR 測定結果において、ナプロキセンおよびニコチンアミド単独での各 ^{13}C シグナルは 1 本ずつのシグナルで観察されたことから、それぞれ非対称単位に化合物が 1 分子存在する結晶であることが示された (Fig. 4)。ナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal では、単独のナプロキセンおよびニコチンアミドそれぞれとは異なる化学シフトを示し、cocrystal 形成に伴う化学シフト変化が認められた。また、cocrystal におけるニコチンアミド由来の各 ^{13}C シグナルは、1 本ずつのシグナルで観察されたことから、ニコチンアミドは cocrystal 内の非対称単位に 1 分子のみ存在すると考えられた。一方のナプロキセンに由来する ^{13}C シグナルは、化学量論比でニコチンアミドの 2 倍量の積分値で観測さ

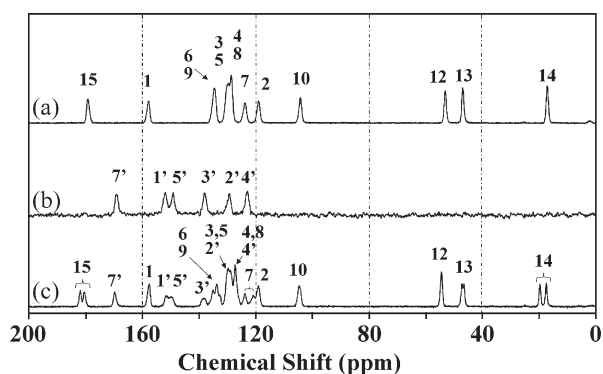


Fig. 4. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) naproxen, (b) nicotinamide and (c) naproxen-nicotinamide cocrystal. Spinning rate: 20 kHz, Recycle delay: (a) 10 s, (b) 300 s, (c) 10 s, Contact time: 3 ms.

れ、さらに、C7, C13, C14 および C15 など、2本のシグナルとして観察されるものいくつか存在していることが認められた。このことは、cocrystal内の非対称単位に1分子のニコチンアミドに対して2分子のナプロキセンが存在することを示しており、また、2分子のナプロキセンは非等価に存在すると考えられた。さらに、2本のシグナルとして観測される炭素原子の周辺で、結晶中に存在する2つのナプロキセンの分子間相互作用様式の違いが大きい可能性が示唆された。ナプロキセン単独の結晶ではナプロキセンのカルボキシル基が関与する水素結合様式は catemer synthon のみの1種であり、カルボキシル基のC15は1種の状態である。一方で、cocrystal形成に伴いナプロキセンのカルボキシル基由来のC15シグナルは、179.2 ppm から180.4および181.8 ppmへの低磁場シフトが観察された。このことからcocrystal中でナプロキセンとニコチンアミドが形成している水素結合は、ナプロキセン単独での結晶中でナプロキセン同士が形成していた水素結合と比べて、より強固で且つ2種の水素結合様式になったと考えられた。

4.3 ^1H MAS NMR 測定による解析

4.1での帰属結果より、ナプロキセンでは11.9 ppmに、ナプロキセン-ニコチンアミドcocrystalでは13.3および15.8 ppmに観測された ^1H シグナルが、ナプロキセンのカルボキシル基のH17シグナルであることが認められた (Fig. 5)。このカルボキシル基のH17シグナルが観察されたことから、ナプロキセンおよびナプロキセン-ニコチンアミドcocrystalのカルボキシル基は、固体状態で非イオン化状態

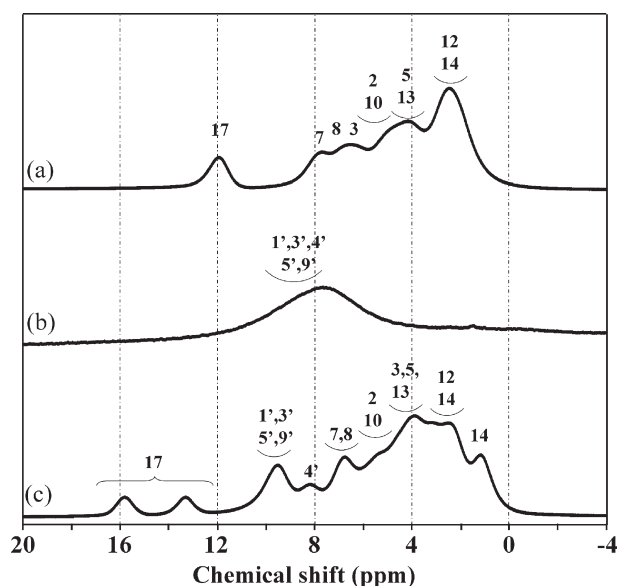


Fig. 5. ^1H MAS NMR spectra of (a) naproxen, (b) nicotinamide and (c) naproxen-nicotinamide cocrystal. Spinning rate: 40 kHz, Recycle delay: (a) 10 s, (b) 300 s, (c) 20 s.

であることが ^1H MAS NMR測定から確認できた。また、cocrystalにおいて、ナプロキセンのカルボキシル基のH17シグナルの ^1H 化学シフトが、ナプロキセン単独の11.9 ppmからcocrystal形成に伴い13.3および15.8 ppmへ低磁場シフトしたことが観察された。これは ^{13}C CP/MAS NMR測定結果におけるC15シグナルの化学シフトの低磁場シフトと同様であり、cocrystal形成により強固な水素結合を形成したことを裏付ける結果と考えられた。さらに、cocrystalにおいてH17シグナルは2本の ^1H シグナルとして観察されたことから、 ^{13}C CP/MAS NMR測定結果と同様にcocrystal中の非対称単位に2分子のナプロキセンが存在することを示すと共に、2種のsynthonが存在すると考えられた。また、ナプロキセンのナフタレン環のH3およびH7シグナルの化学シフトは、ナプロキセン単独での結晶中で6.2および7.6 ppmであったが、ナプロキセン-ニコチンアミドcocrystal中では4.1および7.0 ppmにそれぞれ高磁場シフトを示した。これは環電流に基づくanisotropy効果と推察され、cocrystal形成に伴いナフタレン環同士のCH- π 相互作用がより強まったと考えられた。

4.4 ^1H - ^{13}C CP-HETCOR NMR 測定による分子間相互作用の解析

接触時間5 msでのナプロキセン-ニコチンアミド

cocrystal の ^1H - ^{13}C CP-HETCOR NMR 測定結果を詳細に解析し、ナプロキセン・ニコチンアミド間の分子間相互作用様式を評価した (Fig. 3)。接触時間 5 ms の条件では分子内での共有結合で直接結合している原子間の分子内相互作用に加えて、比較的距離の近い原子間の分子間相互作用がクロスピークとして観測され、直接的に分子間相互作用の議論が可能である。クロスピーク i および ii は先の帰属に用いた通り分子内での共有結合を介した相関を示している。一方、クロスピーク iii では、ニコチンアミドのアミド基の C7' とナプロキセンのカルボキシル基の H17 との分子間での相関が観測されている。このことから 13.3 ppm に観測されたカルボキシル基の H17 シグナルは、アミド基との分子間水素結合 O17-H17...O8'=C7' を形成しているカルボキシル基の H17 と判断された。さらに、クロスピーク iv はニコチンアミドのピリジン環にある N6 の隣に存在する C5' とナプロキセンのカルボキシル基の H17 の分子間での相関を示し、両者の空間的な距離が比較的小さいことが分かる。このことから、15.8 ppm に観測されたカルボキシル基の H17 シグナルが、ピリジン環と分子間水素結合 O17-H17...N6' を形成しているカルボキシル基の H17 と考えられ、先の 13.3 ppm に観測されたカルボキシル基の H17 とは異なる分子間水素結合様式であると判断された。従って、 ^1H - ^{13}C CP-HETCOR NMR 測定結果からも cocrystal 中ではカルボキシル基が関与する synthon が 2 種あると考えられた。

5. 単結晶 X 線構造解析

固体 NMR 測定から予測された相互作用様式について、ナプロキセン-ニコチンアミド cocrystal の単結晶 X 線構造解析を行うことにより結晶構造を明らかにし、固体 NMR 法による解析の妥当性を検討した。単結晶 X 線構造解析結果から、cocrystal の結晶内の非対称単位にナプロキセン 2 分子、ニコチンアミド 1 分子が存在しており、ナプロキセンおよびニコチンアミド間の分子間水素結合は 4 種の様式が存在していた。これらは、カルボキシル基とピリジン環およびアミド基間、カルボキシル基とアミド基間の 2 種の synthon であることが明らかとなった。非対称単位にある 2 分子あるナプロキセンのうち、一方のナプロキセンは、ナプロキセンのカルボキシ

ル基とニコチンアミドのピリジン環との間で形成される O17-H17...N6' および、カルボキシル基とニコチンアミドのアミド基との間で形成される C15=O16...H9'-N9' の 2 種の水素結合を形成していた。もう一方のナプロキセンは、ナプロキセンのカルボキシル基とニコチンアミドのアミド基との間で形成される O17-H17...O8'=C7' および C15=O16...H9'-N9' の水素結合を形成し、cyclic carboxyl-amide synthon を形成していた。加えて、ナプロキセンの stacking によるナフタレン環同士の CH- π 相互作用を形成していることが認められた。

これらの単結晶 X 線構造解析結果は固体 NMR 法による解析結果を支持していたことから、HETCOR NMR 測定に代表される固体 NMR 測定による解析は cocrystal のような複合体結晶の分子間相互作用の評価に対して有効であると言え、今後の幅広い応用が期待される。

6. おわりに

製剤という分野に限らず世の中には古くから研究されているにもかかわらず、改善の余地のある事象や解明できていない事象は多々あると思う。高校生の時に思い描いた化学変化に伴い新たなモノを見出すのではないが、新たな物性改善手法を見出すことならびにその物性を顕わにする手法を見出すことにより、微力ながら今後の創薬および製剤設計への寄与ができるよう努力していきたいと考えている。

本研究を行うに際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました山本恵司教授、森部久仁一教授、東頭二郎助教に深甚なる感謝の意を表すとともに、本研究に多くの助言と協力を頂きました塩野義製薬株式会社 開発研究所、フロンティア医薬研究所の諸氏に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) K. Yamamoto, W. Limwikrant, K. Moribe, Analysis of molecular interactions in solid dosage forms; challenge to molecular pharmaceutics, *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 147-154 (2011).
- 2) S. Ando, J. Kikuchi, Y. Fujimura, Y. Ida, K. Higashi, K. Moribe, K. Yamamoto, Physicochemical characterization and structural evaluation of a specific 2:1 cocrystal of naproxen-nicotinamide, *J. Pharm. Sci.*, **101**, 3214-3221 (2012).