

博 士 論 文

レボフロキサシン-アセトアミノフェン類縁体共結晶
による物性改善及び構造学的研究

本論文は千葉大学大学院医学薬学府博士論文である

2019 年 3 月

千葉大学大学院

医学薬学府

篠 崎 妙 子

目次	1
序論	3
実験の部	8
総論の部	14
第1章 LVFX-APAP 類縁体共結晶の調製	15
第1節 LVFX-APAP 類縁体共結晶のスクリーニング	16
第2節 LVFX-AMAP 共結晶形成評価	17
第3節 LVFX-AMAP heated-GM の分子状態評価	25
第2章 単結晶 X線回折測定による LVFX-AMAP 共結晶の構造評価	27
第1節 LVFX-AMAP 共結晶の単結晶 X線構造解析	28
第2節 LVFX-AMAP と LVFX 水和物の構造比較	37
第3節 AMAP 位置異性体の LVFX 共結晶形成に関する考察	39
第3章 LVFX-AMAP 共結晶の物理化学的特性	40
第1節 LVFX-AMAP 共結晶の溶出性評価	41
第2節 LVFX-AMAP 共結晶の吸湿性評価	42
第3節 LVFX-AMAP 共結晶の物理的及び化学的安定性	44
第4節 LVFX-AMAP 共結晶の光安定性	47
結語	52
謝辞	54

参考文献	55
論文目録	60
主査、副査名	61

序論

医薬品の原薬形態の多くは結晶であるが、その形態は多様に存在する。医薬品開発において、リード化合物が最適化され開発候補化合物が選定された後、原薬形態の最適化が行われる。Figure 1 に原薬形態の概略を示す。申請上同一化合物として扱われる結晶多形や非晶質の他、付加体として水・溶媒和物、塩、共結晶などがある。各形態は溶解性、安定性などの物理化学的特性が異なることから、最良の医薬品を提供するためには、最良の物理化学的特性を有する形態を選択することが求められる。一般的に、塩は構成分子間の相互作用の中にイオン結合が存在する結晶と定義されるのに対し、共結晶は同一結晶格子内に存在する2つあるいはそれ以上のイオン化していない分子によって構成される分子複合体結晶として定義される。共結晶の構成成分の中で、active pharmaceutical ingredients (API) 以外の分子は、coformer または guest と呼ばれ、広義な意味では溶媒和物及び塩も共結晶に含まれる。

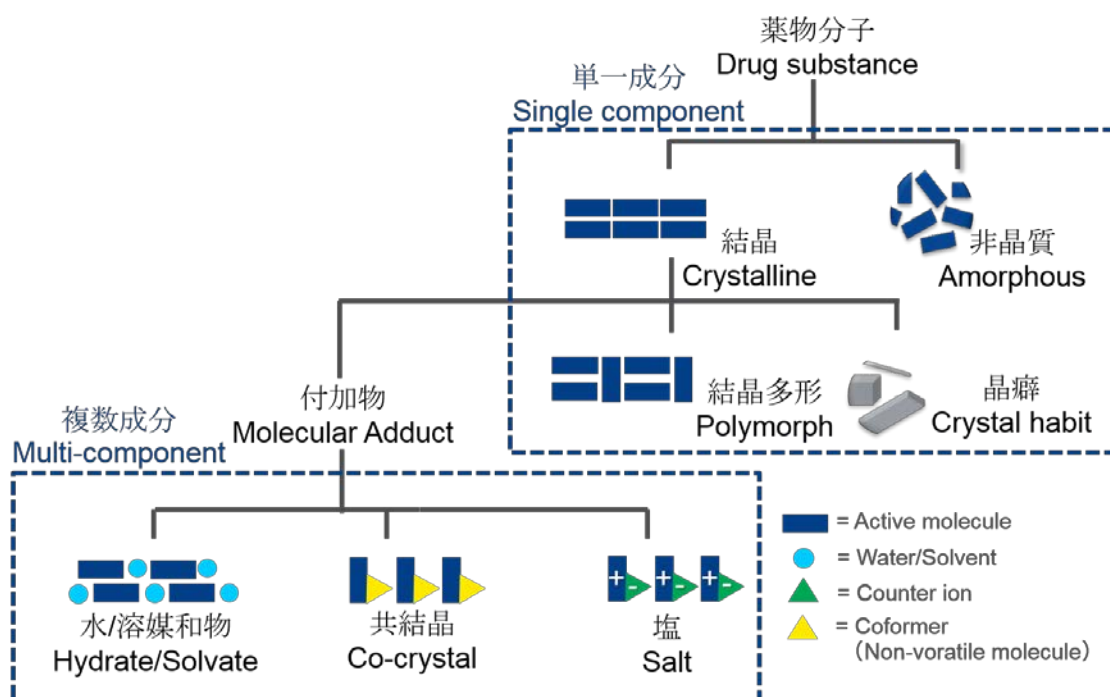


Figure 1. Classification of pharmaceutical solid forms.

塩は限られた数の酸性または塩基性のカウンターイオンからなる一方、共結

晶は解離基の有無に関わらず数100以上の幅広い種類のcoformerを選択できる。2000年代後半から医薬品開発において、標的となる受容体との結合性が重視されるに伴い脂溶性が高く、難溶解性を示す化合物が増加してきた。このため、塩に加えて共結晶も着目され、溶解性や経口吸収性の改善を主目的として研究が盛んに行われている。近年では共結晶についてのガイドラインも整備されつつある。2016年にはFood and Drug Administration (FDA) がガイドラインを改定し「共結晶を溶媒和物の一種として扱う」とし、2018年に最終化されたために現在USとEUでは共結晶はAPIの一種とされた^{1,2)}。これを受けて日本でもガイドラインの策定が呼びかけられている。共結晶の有用性は上述した通りであるが、医薬品用途として開発を進める上でcoformerの安全性情報は当然重視される。Coformer の選択には一般的にはGenerally Recognized As Safe (GRAS³⁾, FDA) の記載情報が参考とされることが多いが、近年では薬物をcoformerとして選択した薬物-薬物 共結晶の研究も進んできている⁴⁻⁸⁾。薬物-薬物 共結晶は物理化学的特性の改善に加えて、薬理学的利点や患者の服薬コンプライアンスの改善が期待される。たとえば、米国ではネプリライシン阻害薬であるサクビトリルとアンジオテンシン受容体拮抗薬であるバルサルタンの共結晶は慢性心不全の配合剤治療薬エントレスト (ノバルティス) として2015年に承認され上市されている⁹⁾。また、シクロオキシゲナーゼ2選択的阻害薬であるセレコキシブとオピオイド鎮痛薬であるトラマドールは共結晶化により溶解性およびバイオアベイラビリティを改善でき、E-58425 (Laboratorios del Dr.Esteve) として開発され第2相臨床試験に成功している^{9,10)}。

ニューキノロン系合成抗菌薬レボフロキサシン (LVFX, Figure 2) は、幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有しており、様々な感染症に使用されている^{11,12)}。投与経路としては経口剤、注射剤、点眼剤があり、用法用量は経口投与の場合1回500 mgを1日1回とされている。LVFXはオフロキサシンの*S*-エナンチオマーであり、通常環境では $\frac{1}{2}$ 水和物 (LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O) として存在する。これまでに4つの無水物 (α , β , γ 及び δ) 及び2つの水和物、LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O及び1水和物 (LVFX \cdot H₂O)

が報告されている。これらの水和物は約50°Cで加熱することにより、それぞれ無水物の γ 形及び α 形に変換されるが、実験室環境下では速やかに復水し、元の水和物に戻るため、無水物の物理化学的特性については明らかになっていない。なお、LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O及びLVFX \cdot H₂Oの結晶構造は既知である¹³⁻¹⁵⁾。さらに、最近Freitasらにより昇温X線粉末回折を用いて無水物 γ 形及び α 形の結晶構造が決定された¹⁶⁾。

LVFXは多くの場合、解熱鎮痛薬のアセトアミノフェン（パラセタモール（APAP；*N*-アセチル-*p*-アミノフェノール））と共に処方される。APAPはアミド基及びヒドロキシ基を有しているため分子間水素結合を形成しやすく、打錠特性の改善などを目的としてこれまで10種類を超える共結晶が報告されている¹⁷⁻²⁰⁾。APAPは一般用医薬品の感冒薬にも広く含有されているが、副作用として肝毒性を示すことが知られている。肝障害の発症頻度が高まる恐れから、2014年にFDAはAPAPを325 mg以上含有する医薬品の処方中止を勧告した。APAPの位置異性体であるメタセタモール（AMAP；*N*-アセチル-*m*-アミノフェノール）の解熱鎮痛作用はAPAPと同じである一方、AMAPはマウスで毒性を示さない。この違いは、ミトコンドリアタンパク質に結合した反応性代謝物の量が異なることによると報告されている。オルトセタモール（AOAP；*N*-アセチル-*o*-アミノフェノール；2-アセトアミドフェノール）もハムスターでAPAPよりも低い毒性を示したという報告がある^{21,22)}。

共結晶は塩と異なりcoformerの選択肢が多いため、効率的に最適な結晶を見出すためにスクリーニング方法も数多く報告されている。現在、溶媒蒸発

（Evaporation）法^{23,24)}、溶媒懸濁（Slurry）法^{25,26)}、粉碎（Grinding）法^{27,28)}、及び溶融（Melt）法²⁹⁾などが用いられている。Evaporation法及びSlurry法は薬物と共結晶との溶解度差を利用する手法であり、工業化におけるスケールアップの効率性が良いことから広く汎用されている。薬物とcoformerの溶解度差が大きい場合には晶析溶媒に対して溶解度の低い方の成分が単独で結晶化することから、これらの手法で共結晶を形成させるためには、晶析溶媒中での薬物及びcoformerの溶解度と生成する共結晶の溶解度との関係を把握しておく必要が

ある。**Slurry**法は懸濁状態でオストワルトの段階則に従って共結晶を形成させる手法であり、スループット性は低いが発熱学的安定形が得られやすいという利点がある。**Grinding**法はボールミルなどで粉砕することで非晶質状態を経由して固相反応によって相互作用を行わせ、共晶物を生成させる手法である¹⁰⁾。スループット性及び反応性が高く、溶解度に依存しないために**Slurry**法では形成されなかった共結晶が確認される場合もある²³⁾。また、近年では、**Grinding**法に触媒として溶媒を少量加える**Liquid Assisted Grinding (LAG)** 法もヒット率が高いためスクリーニングに広く使用されている³⁰⁾。**Melt**法は加熱により混合物の表面接触を増やす方法で、スループット性は低いが発熱学的安定形が得られやすいという利点がある。山下らは、示差走査熱量 (DSC) 測定を用いた加熱法により、粉砕混合物の熱処理で共結晶を形成することに成功した^{31,32)}。

Singh らは、LVFX について、GRAS 記載の coformer を用いて LAG 法にてスクリーニングを行い複数の塩を取得している¹⁵⁾。また、Bandari らは Evaporation 法によってパルミチン酸共結晶及びサッカリンナトリウムとの多成分共結晶を調製し、苦味マスキングや LVFX の溶解速度の改善を報告している³³⁾。しかし、LVFX 共結晶の単結晶 X 線構造解析に成功した例はまだ報告されておらず、LVFX 共結晶の詳細な結晶構造及び分子間相互作用様式は明らかにされていない。

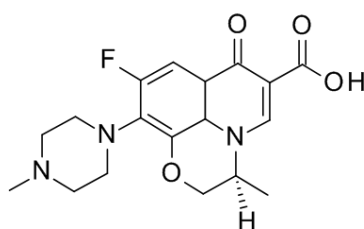


Figure 2. Chemical structure of levofloxacin (LVFX).

本研究では、これまで単結晶構造の報告のなかった LVFX 共結晶の検討を行い、単結晶構造を取得することにより構造と物理化学的特性を明らかにすることを目的とした。第 1 章では LVFX と APAP の類縁体 9 種類についてスクリー

ニング検討を行い、薬物-薬物 共結晶の調製を試みた。第 2 章では第 1 章のスクリーニング検討より生成が確認された AMAP との共結晶の単結晶を調製し、単結晶 X 線構造解析によりその結晶構造及び分子間相互作用様式を評価し、その詳細を検討した。第 3 章では LVFX-AMAP 共結晶の原薬形態としての有用性を検討するために溶出性、吸湿性、温湿度に対する物理的安定性、化学的安定性、及び光安定性などの物理化学的特性の評価を行った。

実験の部

実験の部

1. 試料

原料として LVFX $\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 及び LVFX $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (第一三共株式会社、Lot No ABA1972 及び MK-2788) を用いた。APAP 類縁体である APAP、AOAP、AMAP、4'-アミノアセトアニリド、3'-アミノアセトアニリド、3'-メチルアセトアニリド、3'-ニトロアセトアニリド、4'-フルオロアセトアニリド、及び4'-アセトアミドチオフェノールは、富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。その他の試薬及び溶媒は試薬特級及び高速液体クロマトグラフィー用グレードのものをそのまま用いた。Figure 3 に APAP の類縁体 9 種類の構造式を示す。

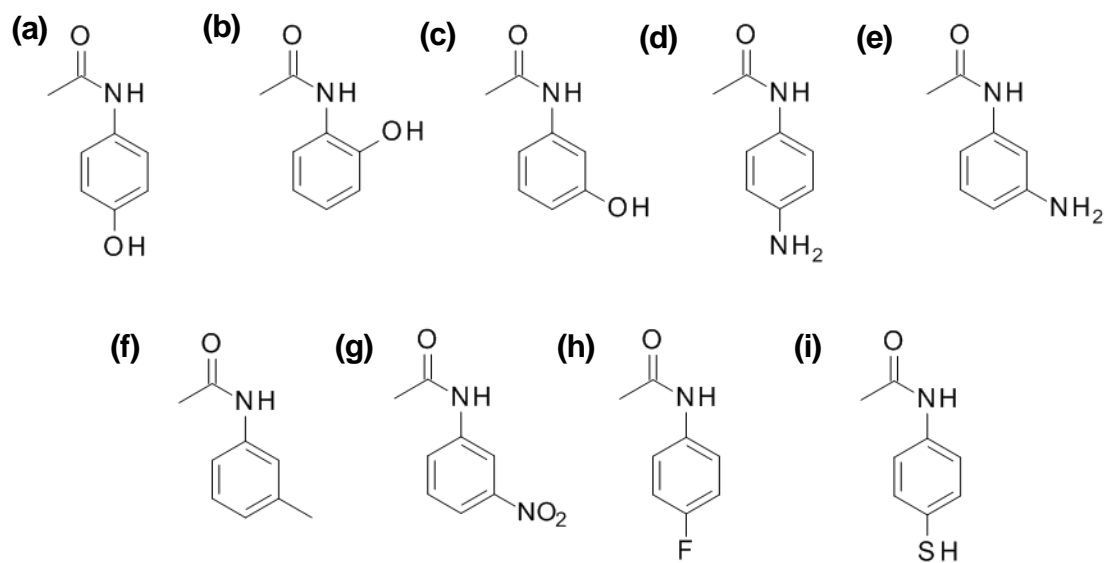


Figure 3. Chemical structures of (a) paracetamol (APAP), (b) ortocetamol (AOAP), (c) metacetamol (AMAP), (d) 4'-aminoacetanilide, (e) 3'-aminoacetanilide, (f) 3'-methylacetanilide, (g) 3'-nitroacetanilide, (h) 4'-fluoroacetanilide, and (i) 4'-acetamidothiophenol.

2. 検体調製

2-1. LVFX -AMAP 共結晶調製

LVFX (LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O 及び LVFX·H₂O)及び APAP 類縁体をモル比 1:1 で Shake Master NEO (Bio Medical Science 製) を用いて 1,500 rpm、5 分間粉碎して粉碎混合物 (GM) を調製した。この GM をホットプレート上で 120°C、5 分間加熱した後、室温まで冷却して加熱混合粉碎物 (heated-GM)を得た。各試料は、粒径の影響を最小限にするために 40 mesh 篩 (Tokyo screen 製) で篩過し、各種試験に使用した。

2-2. LVFX-AMAP 共結晶の単結晶調製

2-1 で調製した heated-GM をアセトニトリルに 10 mg/mL で 120°C 加温溶解させ、その後室温にてデカンを加え静置することにより板状の単結晶を得た。

3. 測定法

3-1. Thermogravimetry (TG) /Differential scanning calorimetry (DSC) 測定

TGA/DSC-1 system (メトラートレド株式会社製) を用いて実施した。アルミニウムパン (開放) に約5 mgの試料を秤量し、100 mL/minの窒素気流下にて昇温速度10 °C/min で30°Cから250°Cまで測定した。測定及び解析用ソフトウェアにはSTARe (メトラートレド株式会社製, version 6.10) を用いた。

3-2. X-ray powder diffraction (XRPD) 測定

XRPD 測定は、室温及び昇温条件下で実施した。室温での XRPD 測定には、X 線回折装置 Empyrean (PANalytical 社製) を用いた。試料約 50 mg を無反射試料板にのせ、平らになるよう成形して測定した。X 線源は CuK α 線源 ($\lambda=0.154$ nm) を用い、管電流 45 mA、管電圧 40 kV に設定した。データは走査スピード 2°/min で走査角 (2θ) 5° から 35°まで取得した。

昇温XRPD測定は、X線回折装置 RINT-III (リガク株式会社製) にDSCモジュールを組み合わせて実施した。アルミニウムパン (開放) に約2 mgの試料を秤量し、100 mL/min

の窒素気流下にて昇温速度2°C/minで30°Cから160°Cまで測定した。X線源はCuK α 線源 ($\lambda=0.154$ nm) を用い、管電流45 mA、管電圧40 kVに設定した。データは走査スピード0.2°/minで走査角 (2θ) 5°から35°まで取得した。結果はXRD+DSCマネージャソフトウェア (リガク株式会社製, version 2.4) を用いて解析した。

3-3. Infrared (IR) 測定

IR 測定は ALPHAFTIR 分光計 (Bruker 製) を用いて KBr で評価した。測定は、4 cm⁻¹ の分解能、32 回測定で 400~4000 cm⁻¹ の波数域を評価した。

3-4. 単結晶 X 線構造解析

単結晶 X 線構造解析はリガク製イメージングプレート単結晶自動 X 線構造解析装置 R-AXIS RAPID (Cu-K α 線、波長 $\lambda=1.54187\text{\AA}$) を用いた。測定には大きさ 0.368 mm \times 0.163 mm \times 0.120 mm の無色の単結晶を用い、ガラスファイバー上に取り付け測定した。窒素吹付型冷却装置により -165°C 条件下で測定を行い、5368 個の独立な反射強度を収集し回折強度測定を実施した。SIR-2004 を用いて直接法による初期構造探索を行い、結晶構造の精密化を行った。フーリエ合成法により H 原子を除く原子の位置を求めた。構造精密化には SHELXL-97 を用いた。H 原子を除く原子についての構造の精密化は異方性温度因子を含んだ形でのフルマトリックス最小二乗法により行った。また、H 原子の位置は差フーリエ合成の結果から決定し、精密化は riding model を用いフルマトリックス最小二乗法によって実施した。SHELXL による精密化を除き、全ての計算は CrystalStructure10 crystallographic software package を用いて行った。

3-5. 結晶構造データベース検索

有機化合物の結晶構造データベースである、Cambridge Structural Database (CSD version 5.38; with updated data added on May 2017; Groom et al 2016)³⁴⁾に登録されている結晶構造から ConQuest 1.17 を用いて AMAP (CSD コード: MENSEE)、LVFX \cdot 1/2H₂O (CSD コード: YUJNUM02)、及び LVFX \cdot H₂O (CSD コード: YUJPAU01) の結晶構

造を検索した。

3-6. 密度汎関数法 (DFT) 計算

AMAP のヒドロキシル基の位置の変化に伴う結晶構造中の synton の安定性を DFT 計算から考察した。Materials Studio 7.0 (BIOVIA 製) の Forcite モジュールを用いて分子の構造を最適化した後に、CASTEP モジュールを用いて計算を行った。汎関数には GGA-PBE を選択した。

3-7. 溶出試験

溶出試験は NTR-6100A (富山産業株式会社製) を用いた。約 20 mg の検体を用いて試験液として第 17 改正日本薬局方溶出試験液第 1 液 (JP1 ; pH1.2) 及び日本薬局方崩壊試験第 2 液 (JP2 ; pH6.8) 900 mL を用いて、パドル法により $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の温度で毎分 50 rpm で試験を行った。規定時間に自動サンプリング装置にて、試験液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μm 以下) でろ過し、試料溶液とした。試料溶液につき、第 17 改正日本薬局方一般試験法「2.24 紫外可視吸光度測定法」により試験を行い、波長 280 nm における吸光度により LVFX の溶出率を求めた。試験は n=2 で実施した。

3-8. 水蒸気吸脱着 (Dynamic Vapor Sorption : DVS) 測定

水蒸気吸脱着測定は DVS Advantage-1 (Surface Measurement Systems) を用いて実施した。各検体を約 10 mg アルミニウムパンに量り、 25°C 環境下において 0% 相対湿度 (Relative Humidity : RH) で乾燥後、相対湿度を変化させたときの質量変化を評価した。相対湿度は 0.02%/分、水分吸着過程は 10% ステップで 0~60% RH 及び 5% ステップで 60~95% RH まで変化させた。また、水分脱着過程は 5% ステップで 95~60% RH 及び 10% ステップで 60~0% RH まで変化させた。平衡化最大時間は 120 分、平衡化終点の質量変化率は 0.0006% に設定した。

3-9. 物理化学的安定性

各検体を約 5 mg ずつ精密に秤量しガラス容器に保存した。保存条件は、60°C（密閉）、25°C/60%RH（開放）、及び40°C/75%RH（開放）で4週間まで保存した。経時的に保存試料を取り出し、結晶形を XRPD 分析により評価した。試料中の LVFX、主な分解生成物、及び総不純物の含有量について、0.03 mol/L HCl の試料溶液を用いて 0.1-0.4 mg/mL の濃度に希釈したものを試料溶液とし、HPLC により評価した。

[HPLC の分析条件]

HPLC 装置は Alliance システム（Waters 製）、カラムは Atlantis dC18 5 µm, 4.6 × 150 mm（Waters 製）、移動相は 5 mmol/L 硫酸銅及び 0.1 mol/L の酢酸アンモニウムと混合した 15 mmol/L L-バリン緩衝液（pH2.5）:アセトニトリル = 80:20（v/v）、流速は 1.0 mL/min、カラム温度 45°C、検出紫外波長 230 nm、注入量 50 µL の条件で分析した。

3-10. 光安定性

固体状態については各検体を約 100 mg ずつシャーレ（6 cm）に薄く広げ、25°C/60%RH、2000 lx の照射量で最大照射量 60 及び 120 万 lx・h まで D65 ランプで照射した。保存後のサンプルの外観及び色差 ΔE^*_{ab} を評価した。色差は、分光測色計 CM-3500d（コニカミノルタ株式会社製）を用いて、白色板を対象とした色差を測定した。400-700 nm の範囲で測定し、以下の色差式に従って、色差（ ΔE^*_{ab} ）を計算した。

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

ここで、 ΔL : 開始時及び経過時の色差 L の差、 Δa : 開始時及び経過時の色差 a の差、及び Δb : 開始時及び経過時の色差 b の差である。また、開始時との色差（ ΔE ）の変化量を算出した。溶液及び懸濁状態については各結晶を精密に秤量し、5 mL のメスフラスコに入れ、Britton-Robinson 緩衝液（pH7）で希釈して、それぞれ 0.1%（w/v）溶液及び 20%（w/v）懸濁液を調製した。各メスフラスコを、固体状態と同様の条件で保存し、60 及び 120 万 lx・h 時点で取り出した。試料中の LVFX、主な分解生成物、及び総不純物の含有量について物理化学的安定性と同様の条件で HPLC により評価した。

総論の部

第 1 章 LVFX-APAP 類縁体共結晶の調製

本章では、これまで共結晶の報告が少ない合成抗菌薬 LVFX 共結晶の調製を目的とし、同時に処方されることが多い解熱鎮痛薬 APAP とその類縁体 9 種の類縁体の GM (1:1 mol/mol) を調製した。得られた GM について DSC 測定を実施し、共結晶形成に由来する発熱ピークの有無を評価した。本スクリーニングの結果から共結晶形成が示唆された LVFX-AMAP の系について、TG-DSC 測定及び昇温 XRPD 測定を行い、昇温に伴う共結晶形成を観察した。次に化学量論比を確認するために LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O/AMAPGM のモル比を 1:1、1:2 及び 2:1 に変化させ、DSC 測定により熱的挙動を評価した。スクリーニングに用いた LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O は加熱に伴い脱水後 LVFX 無水物 γ 形に転換する。一方、水和数の異なる LVFX·H₂O は脱水後に LVFX 無水物 α 形が得られる。そこで、LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O と同様に、LVFX·H₂O を用いた場合でも AMAP との共結晶が形成するか検討した。さらにスケールアップ晶析として LVFX-AMAPGM をホットプレートで 120 °C、5 分間加温することにより heated-GM を調製した。Heated-GM について XRPD 測定及び DSC 測定を行い、LVFX-AMAP 共結晶形成を確認した。この heated-GM について IR 測定を行い、共結晶中の LVFX と AMAP の分子状態を評価した。

第1節 LVFX-APAP 類縁体共結晶のスクリーニング

9つのAPAP類縁体をcoformerとして用いて、LVFX共結晶形成のスクリーニングを実施した。LVFX-APAP類縁体を1:1のモル比にて混合粉碎しGMを調製した。各GMについてXRPD測定を行い、結晶転移の有無を確認した。いずれのGMのXRPDパターンも各PMと同様であり(data not shown)、粉碎による結晶転移等は認められなかった。次に、これらのGMについてDSC測定を行い、共結晶由来の発熱ピークの有無を確認した。AMAPを除く8種のAPAP類縁体のGMのDSC曲線では、50-70°C付近のLVFX・½H₂Oの脱水及びLVFXとAPAPの共融に由来する吸熱ピークが認められたものの、共結晶化に伴う発熱ピークは観察されなかった(Figure 4)。一方、LVFX-AMAP GMのDSC曲線では、共結晶化に伴う発熱ピークが118°Cに検出された(Figure 5c)。この結果より、LVFX-AMAP系においては、粉碎及び加熱により共結晶が形成されることが示唆された。

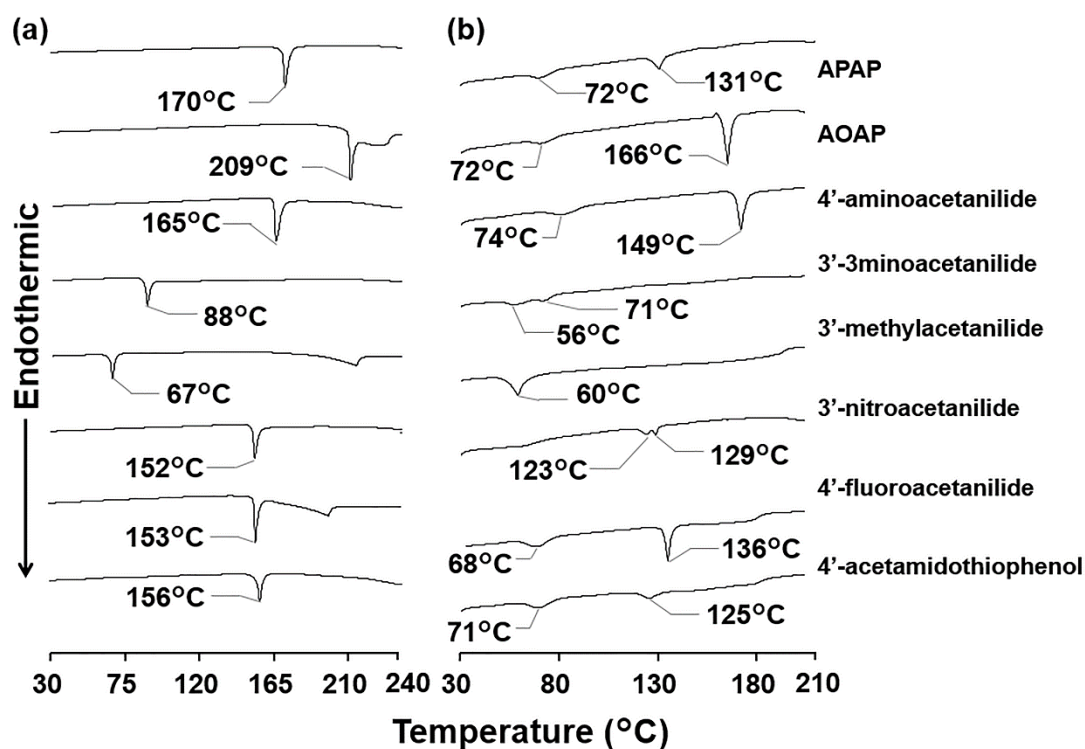


Figure 4. DSC thermograms of (a) APAP analogs and (b) LVFX/AMAP analogs = 1:1.

第 2 節 LVFX-AMAP 共結晶形成評価

粉碎及び加熱により共結晶形成が示唆された LVFX-AMAP 系に着目し、より詳細な検討を行った。初めに、TG-DSC 曲線の解析により、LVFX-AMAP 系の加熱に伴う熱的挙動を評価した。LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O の DSC 曲線では、72 °C に脱水に由来する吸熱ピーク、230°C に無水物 γ 形から無水物 β 形及び α 形への転移ピーク、234°C に無水物 α 形の融解に由来する吸熱ピークが観察された

(Figure 5a)¹³⁾。TG 曲線においては、70°C 付近に LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O 中の水の理論量 (2.49%) に相当する 2.48% の質量減少が認められた。AMAP の DSC 曲線では 148°C に融解する吸熱ピークが認められ、また TG 曲線では融点まで質量減少は認められなかった (Figure 5b)。GM の DSC 曲線では 67 °C に幅 Figure 5c 吸熱ピークが観察された。TG 曲線において 70°C 付近に質量減少が観察されたことから、この吸熱ピークは LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O 脱水に由来すると考えられた。さらに、GM の DSC 曲線では 104°C に LVFX と AMAP の共融に由来する吸熱ピーク、118°C に共結晶形成に伴う発熱ピーク、また 157°C に共結晶融解に由来する吸熱ピークが認められた (Figure 5c)。

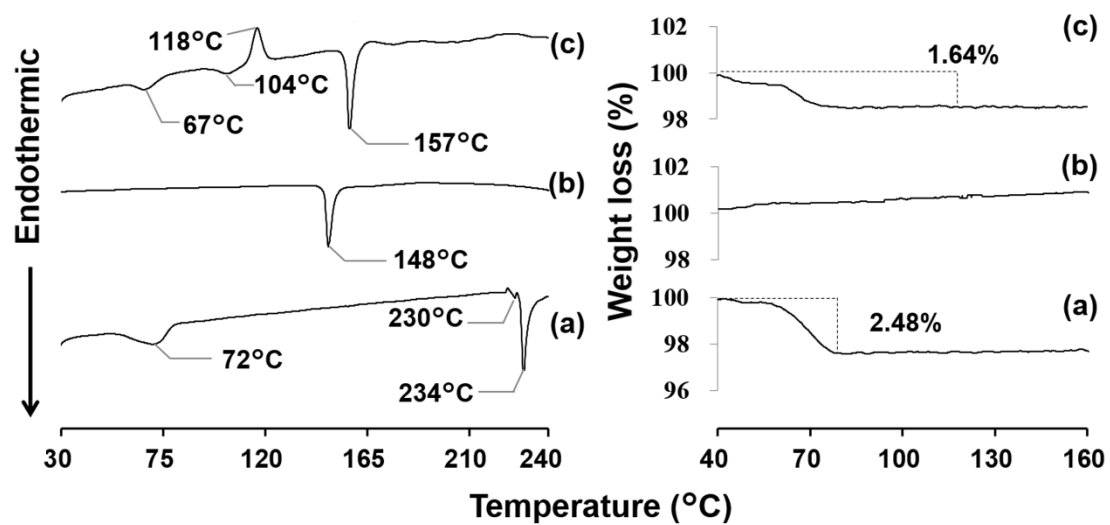


Figure 5. Thermogravimetry (TG:right)/differential scanning calorimetry (DSC:left) thermograms of (a) LVFX·½H₂O, (b) AMAP, and (c) LVFX/AMAP = 1: 1 GM.

次に、TG-DSC 曲線で観察された熱的挙動を確認する目的で、LVFX-AMAPGM について昇温 XRPD 測定を実施した (Figure 6)。TG-DSC 測定の昇温速度は 10°C/min であるのに対して、昇温 XRPD 測定では 2°C/min である。そのため、XRPD パターンでは DSC 曲線よりも低い温度で昇温による熱的变化が観察されている。昇温前の X 線回折パターンでは、LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O 及び AMAP に由来する X 線回折ピークがそれぞれ観察された。70°C の XRPD パターンにおいて LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O の回折ピークが消失し、LVFX 無水物 γ 形に由来する回折ピークが観察された。このことから、DSC 曲線で 67°C に観察された最初の吸熱ピークは、LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O の脱水によることが確認された。102°C の XRPD パターンでは、AMAP に由来するピークがほぼ完全に消失し、LVFX 無水物 γ 形に由来するピーク強度は減少した。このことから、DSC 曲線で 104°C に観察された 2 つ目の吸熱ピークは、LVFX 無水物 γ 形と AMAP の共融に由来するものと帰属した。107 °C の XRPD パターンでは LVFX 無水物 γ 形に加えて LVFX-AMAP 共結晶形成に由来すると考えられる新しい回折ピーク ($2\theta=6.1^\circ$ 、 7.1° 、 9.9° 、 10.7° 、及び 15.9°) が認められた。さらに 116°C の XRPD パターンでは共結晶のピークのみが観察された。このことから、DSC 曲線の 118°C の発熱ピークは共結晶形成に由来することが確認された。XRPD パターンは、DSC 上の最後の吸熱ピークに対応する 157°C を超える温度でハローとなり、これは共結晶の融解に由来するものと考えられた。

上記で観察された加熱による LVFX と AMAP の共融後の共結晶形成について考察を行った。LVFX/AMAP=1:1 の GM を加熱した場合、共融温度においては融点の低い AMAP がほぼ全て融解するのに対して、LVFX は一部が融解する。すなわち、共融温度よりわずかに高い温度では、1:1 のモル比でない非化学量論的な共融物と残存した LVFX 結晶が共存する。非化学量論的な融液に対して LVFX 結晶の融解が進行するにつれ、LVFX-AMAP の過飽和状態となり、AMAP-LVFX 共結晶の核が生成する。更なる加温により、残存した LVFX の LVFX-AMAP 融液への融解が進み、最終的に LVFX-AMAP 共結晶の析出が起こる。このよう

な加熱下での共結晶の形成は Lu らの報告で明らかにされている³⁵⁾。

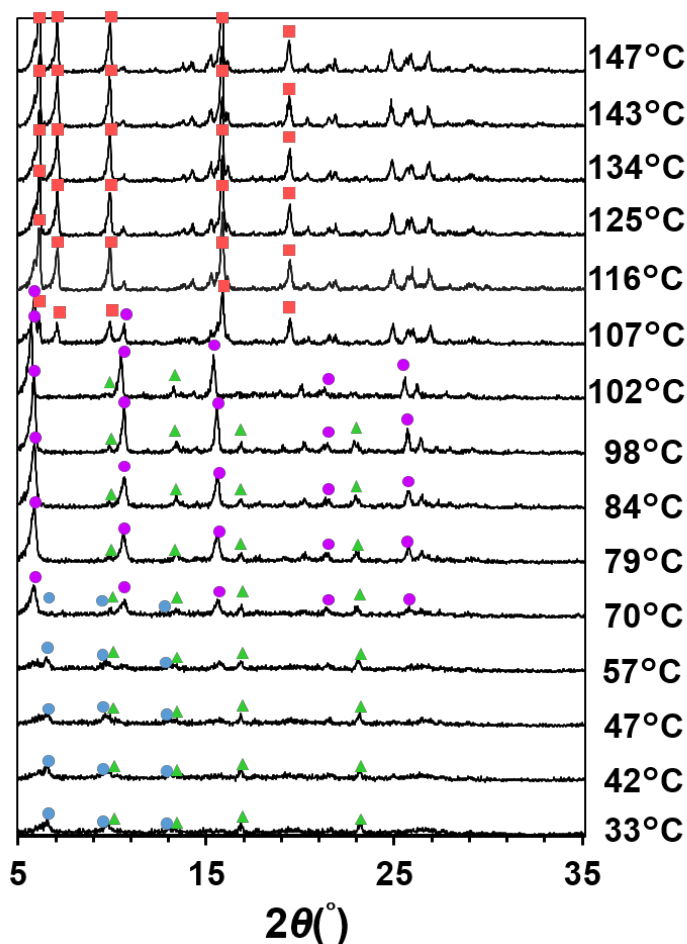


Figure 6. X-ray diffraction pattern of LVFX·½H₂O/AMAP = 1:1 GM at each elevated temperature. (blue circle, purple circle, green triangle, and red square marks in the figure represent the LVFX·½H₂O, LVFX anhydrous γ -form, AMAP, and LVFX-AMAP co-crystal, respectively)

次に LVFX·½H₂O/AMAP GM のモル比を 1:1、1:2 及び 2:1 に変化させ、DSC 測定により熱的挙動を評価した (Figure 7)。2:1 GM の DSC 曲線では、共融に由来する吸熱ピークが 102°C に、共結晶化による発熱ピークが 125°C に検出された。共結晶化温度が 2:1 GM (125°C) で 1:1 GM (118°C) よりも高かった理由として、LVFX に対して AMAP の量が少ないことが考えられる。すなわち、残

存した LVFX 結晶の共融物への物理的な接触が遮られ、LVFX 結晶の共融物への溶解と共結晶化が遅れたと考察した。2:1 GM の DSC 曲線上における共結晶の融解エンタルピー (ΔH) は 54 J/g であり、1:1 GM ($\Delta H=91$ J/g) と比較して低い値を示した。1:2 GM の DSC 曲線では、共融に伴う吸熱ピークは 106°C で観察されたが、共結晶化に伴う発熱ピークは認められなかった。共融物中において多く存在する AMAP が LVFX を可溶化するため、共結晶化に必要な過飽和が抑制されたと考えられた。さらに、148°C では、過剰の AMAP の融解に由来すると考えられるブロードな吸熱ピークが観察された。これらの結果から、LVFX と AMAP は 1:1 の化学量論比で共結晶を形成することが示唆された。

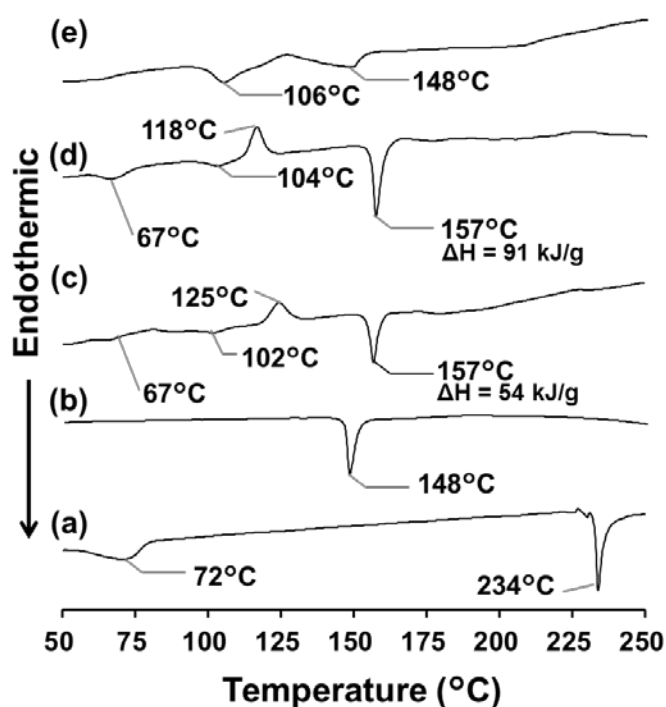


Figure 7. DSC thermograms of (a) LVFX·½H₂O, (b) AMAP, (c) LVFX/AMAP = 2:1 GM, (d) LVFX/AMAP = 1:1 GM, and (e) LVFX/AMAP = 1:2 GM. (ΔH in the figure indicates a melting enthalpy of LVFX-AMAP co-crystal)

LVFX-AMAP の系についてより詳細な構造と物理化学的特性を精査するために、LVFX 約 1 g を用いてスケールアップ晶析を実施した。DSC 測定及び昇温 XRPD 測定の結果に基づいて、LVFX·½H₂O/AMAP 1:1 GM についてホットプレートを用いて 120 °C で 5 分間加熱することにより LVFX-AMAP heated-GM を調製した。Figure 8d に LVFX·½H₂O/AMAP 1:1 heated-GM の DSC 曲線及び XRPD パターンを示す。Heated-GM の DSC 曲線においては LVFX 及び AMAP に由来する熱的挙動は認められず、157°C に LVFX-AMAP 共結晶の融解に由来する吸熱ピークのみが観察された。また、XRPD パターンにおいても、LVFX 及び AMAP に由来する回折ピークは認められず、LVFX-AMAP 共結晶の融解に由来する新しいピークのみが観察された。また、LVFX は TG 曲線で質量減少を示さないことから heated-GM は水和物ではないことを確認した。以上の結果より、heated-GM は LVFX-AMAP は化学量論比 1:1 の共結晶であることが示された。

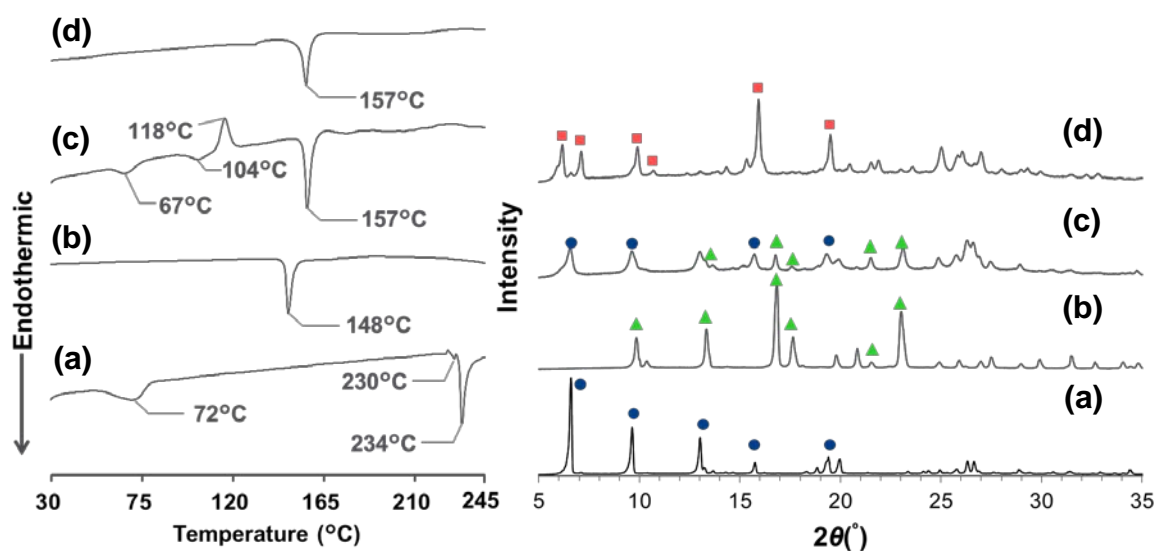


Figure 8. DSC thermograms and XRPD patterns of (a) LVFX·½H₂O, (b) AMAP, (c) LVFX/AMAP=1:1 GM, and (d) LVFX/AMAP=1:1 heated GM. (blue circle, green triangle, and red square marks in the figure represent LVFX·½H₂O, AMAP, and LVFX-AMAP co-crystal, respectively)

さらに、出発原料として LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O の代わりに LVFX·H₂O を用いた場合でも、同様の共結晶が得られるかを検討した。LVFX·H₂O/AMAP=1:1 GM の DSC サーマグラム及び昇温 XRPD パターンを Figure 9 に示す。GM の DSC 曲線においては 59 °C 付近で LVFX·H₂O の脱水に由来する吸熱ピークが観察され、XRPD 測定では LVFX·H₂O のピークが消失し、LVFX 無水物 α 形に由来する回折ピークが新たに観察された。Kitaoka ら¹³⁾ 及び Gorman ら¹⁴⁾ は、LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O 及び LVFX·H₂O から脱水により得られる無水物は、それぞれ γ 形及び α 形を示すことを報告しており、得られた結果は文献と一致していた。DSC 曲線においては 117 °C に共融に由来する吸熱ピークが観察され、XRPD パターンでは LVFX 無水物 α 形及び AMAP に特徴的な回折ピークがほぼ消失した。さらに、DSC 曲線では 126 °C に共結晶化に由来する発熱ピークが観察され、また XRPD パターンにおいても LVFX-AMAP 共結晶に由来する回折ピークが認められた。したがって、LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O と同様に LVFX·H₂O を用いた場合でも、加熱により LVFX-AMAP 共結晶が得られることが明らかとなった。しかし、共融及び共結晶化の温度は、LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O GM と LVFX·H₂O GM との間で異なっていた。この違いは、脱水後に得られる LVFX 無水物の結晶形の違いによると推察される。すなわち、LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O から得られる無水物 γ 形は LVFX·H₂O から得られる α 形よりも低温で AMAP と融解する。そのため、LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O/AMAP GM ではより低い温度で共結晶が形成されたと考察した。LVFX·H₂O/AMAP 1:1 GM についても LVFX· $\frac{1}{2}$ H₂O/AMAP と同様に、120°C で加熱することにより heated-GM を調製した。Heated-GM の DSC 曲線においては LVFX 及び AMAP に由来する熱的挙動は認められず、157°C に LVFX-AMAP 共結晶の融解に由来する吸熱ピークのみが観察された (Figure 9d)。

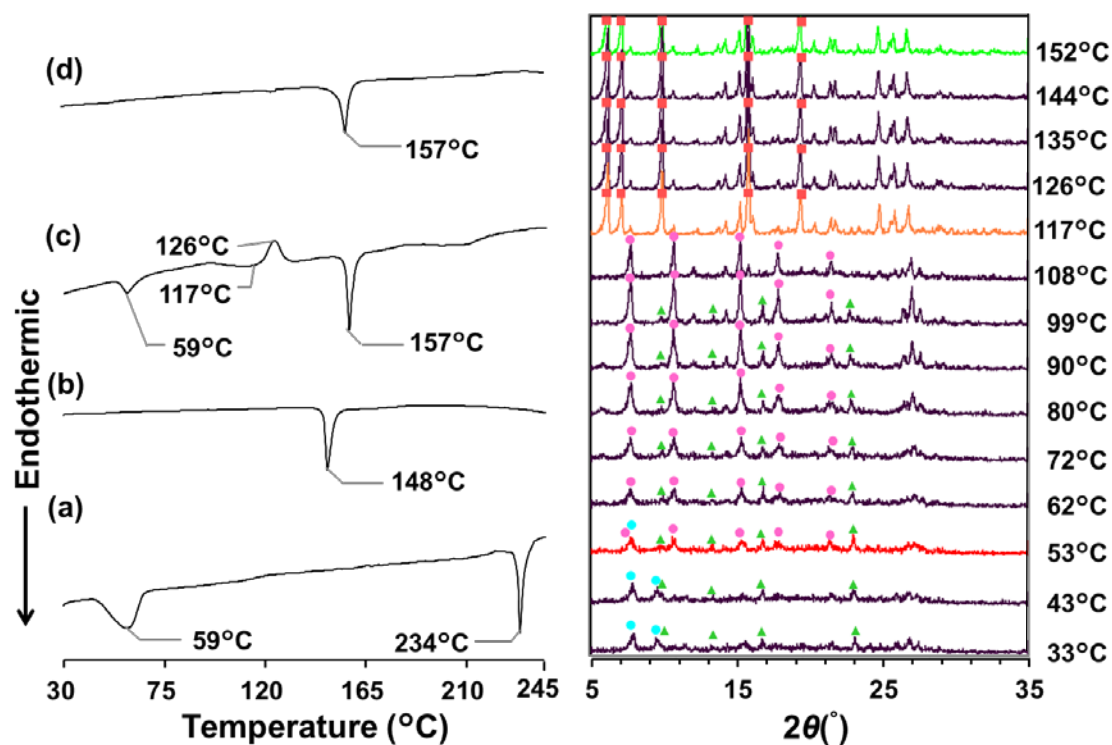


Figure 9. (left) DSC curves of (a) LVFX·H₂O, (b) AMAP, (c) LVFX·H₂O/AMAP = 1:1 GM, and (d) LVFX·H₂O/AMAP = 1:1 heated-GM and (right) XRPD patterns of LVFX·H₂O/AMAP = 1:1 GM at each elevated temperature. (light blue circle, pink circle, green triangle, and red square marks in the figure represent the LVFX·H₂O, LVFX anhydrous α -form, AMAP, and LVFX-AMAP co-crystal, respectively)

第3節 LVFX-AMAP heated-GM の分子状態評価

LVFX-AMAP heated-GM の分子状態を IR 測定により評価した (Figure 10)。

LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O のスペクトルでは、カルボキシル基の C=O 伸縮振動とケトン基の伸縮振動に由来するピークがそれぞれ 1,722 cm⁻¹ と 1,619 cm⁻¹ に観察された³⁶⁻³⁸⁾ (Figure 10a)。3,259 cm⁻¹ のピークはカルボキシ基を含む分子内及び分子間の水素結合を反映している。また、3,422 cm⁻¹ の幅広いピークは、LVFX $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O 中の水分子の振動によるものと考えられる³⁸⁾。AMAP のスペクトルでは、C=O 伸縮振動が 1,663 cm⁻¹、N-H 伸縮振動が 1,610 cm⁻¹ に観測された (Figure 10b)。

AMAP の N-アセチルアミノ基の N-H 伸縮振動は 3,326 cm⁻¹ に、水素結合 O-H 伸縮振動が 3158 cm⁻¹ に検出された。GM の IR スペクトルは、LVFX と AMAP のスペクトルの重ね合わせであり、GM では LVFX と AMAP との相互作用は形成されていないことが示された (Figure 10c)。

一方、heated-GM の IR のスペクトル) は、GM のスペクトルとは明確に異なっていた (Figure 10d)。

Heated-GM のスペクトルでは、水分子の振動に起因するピークは検出されず、LVFX-AMAP 共結晶は結晶格子中に水分子を含まないことが示唆された。LVFX で検出された C=O 伸縮ピークは 1,722 cm⁻¹ から 1,714 cm⁻¹ に低波数シフトし、AMAP の C=O 伸縮ピークは 1663 cm⁻¹ から 1,678 cm⁻¹ に高波数シフトした。AMAP の N-H 伸縮振動に由来する 3,326 cm⁻¹ のピークは 3,339 cm⁻¹ へ高波数シフトした。これらの IR ピークの変化から、LVFX と AMAP 共結晶により N-H (AMAP) \cdots O(LVFX) の水素結合形成が示唆された。

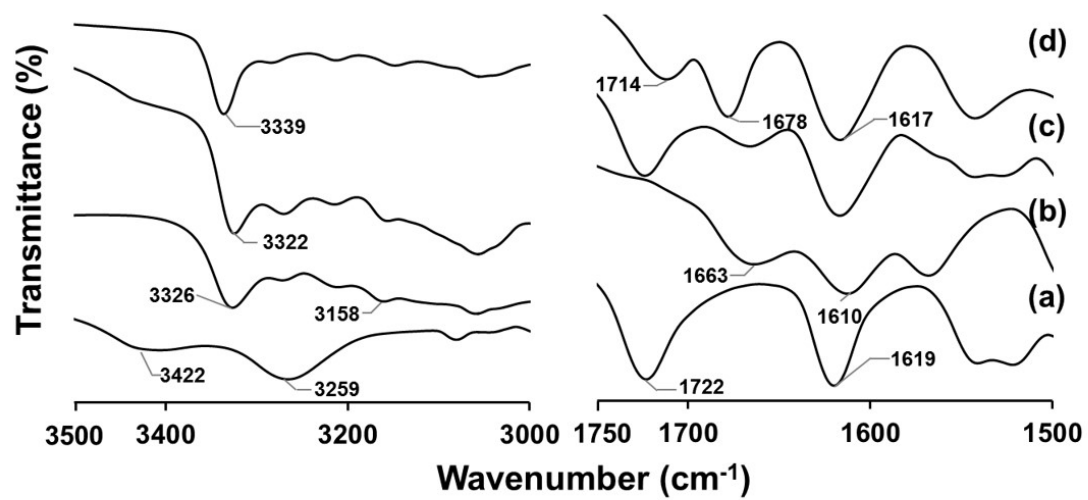


Figure 10. Infrared (IR) spectra of (a) LVFX·½H₂O, (b) AMAP, (c) LVFX-AMAP 1:1 GM, and (d) LVFX-AMAP 1:1 heated-GM.

第2章 単結晶 X線回折測定による LVFX-AMAP 共結晶の構造評価

医薬品複合体結晶の構造を解析し、塩及び共結晶を区別することは製剤設計、各国のレギュレーションに基づく開発戦略や物質特許などの製品開発に大きな影響を与えるため、創薬において重要な研究課題となっている。塩及び共結晶を判別する手法としては、 ΔpK_a による簡易的な方法の他、単結晶構造解析、IR法、固体 NMR法 などがある。前章において IR測定による分子状態の解析を行った結果、LVFX-AMAPの heated-GMにおいて LVFXのカルボニル基と AMAPのアミド基間での N-H...O水素結合の形成が示唆された。本章では、heated-GMと同じ構造を持つ LVFX-AMAP共結晶の単結晶を調製した。そして、単結晶構造解析から、LVFX-AMAP共結晶が塩及び共結晶であるかを判別した。また、LVFX-AMAP共結晶の結晶構造を詳細に検討し、結晶構造が既知である LVFXの2つの水和物との構造的相違点について評価した。さらに、AMAPが LVFXと共結晶を形成するのに対して、構造異性体である APAP及び AOAPが共結晶を生成しない理由について、計算化学的手法を交えて考察した。

第1節 LVFX-AMAP 共結晶の単結晶 X線構造解析

LVFX-AMAP 共結晶の単結晶の調製検討として貧溶媒添加法を検討した。初め LVFX の良溶媒 (2-プロパノール、アセトン、エタノール、アセトニトリル) を用いて、最適な良溶媒について検討した。Heated-GM を各溶媒に溶解し、得られた析出物について XRPD 測定を行い、その結晶形を評価した (Figure 11)。2-プロパノールやアセトンを用いた際に得られた析出物は、LVFX \cdot 1/2H₂O と同じ XRPD パターンを示した。エタノールを用いた場合に得られた析出物は LVFX \cdot 1/2H₂O や LVFX-AMAP heated-GM とは異なる X線回折パターンを示した。一方、アセトニトリルを用いた際に得られた析出物は LVFX-AMAP heated-GM の X線回折パターンと同様であった。以上の結果から、良溶媒としてアセトニトリルを選択した。次に LVFX の貧溶媒であるアルカン (ペンタン、ヘキサン、オクタン、デカン) を用いて、最適な貧溶媒について検討した。良溶媒としてアセトニトリル、貧溶媒としてアルカンを用いて、貧溶媒添加した時に得られた析出物の光学顕微鏡画像を Figure 12 に示す。貧溶媒であるアルカンの炭素数の増加に伴い良質な単結晶が得られた。そこでアセトニトリル/デカン (良溶媒/貧溶媒) の組み合わせを、LVFX-AMAP 共結晶化の溶媒として選択した。LVFX-AMAP heated-GM をアセトニトリルに 120 °C で加温溶解させた後、デカンを加え 40 °C にて静置した。その結果、板状の LVFX-AMAP 共結晶の単結晶を得ることに成功した。この板状の結晶について、-165 °C にて単結晶 X線構造解析を行った結果を Table 1 に示す。LVFX-AMAP 共結晶は単斜晶系であり、空間群 $P2_1$ 、格子定数 $a = 12.4196 (3) \text{ \AA}$ 、 $b = 6.931510 (16) \text{ \AA}$ 、 $c = 14.2404 (3) \text{ \AA}$ 、 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 及び $\beta = 96.011 (7)^\circ$ を示した (Table 1)。単結晶 X線構造解析結果から計算した単結晶の XRPD パターンは、LVFX-AMAP heated-GM の XRPD パターンと同一であり、得られた共結晶の単結晶構造は、LVFX-AMAP heated-GM と同じであることを確認した (Figure 13)。

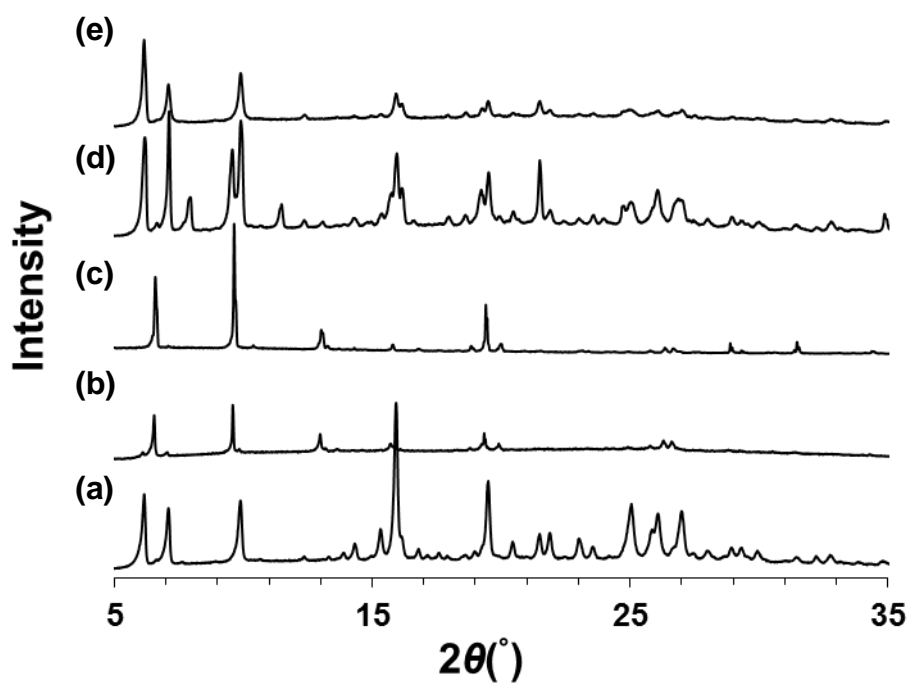


Figure 11. XRPD patterns of (a) LVFX-AMAP heated-GM, (b) LVFX-AMAP precipitate recrystallized from 2-propanol, (c) LVFX-AMAP precipitate recrystallized from acetone, (d) LVFX-AMAP precipitate recrystallized from ethanol, and (e) LVFX-AMAP precipitate recrystallized from acetonitrile.

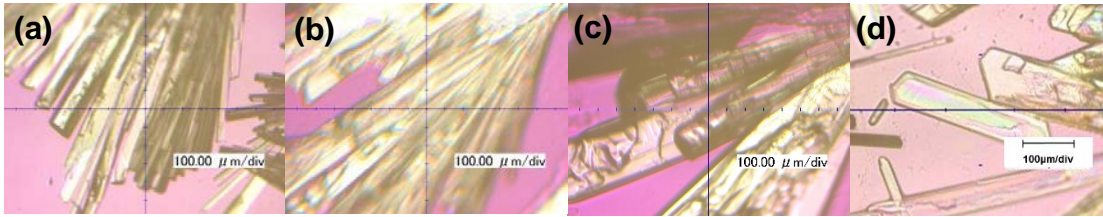


Figure 12. Microscopic images of LVFX-AMAP precipitate recrystallized from (a) acetonitrile/pentane, (b) acetonitrile/hexane, (c) acetonitrile/octane, and (d) acetonitrile/decane.

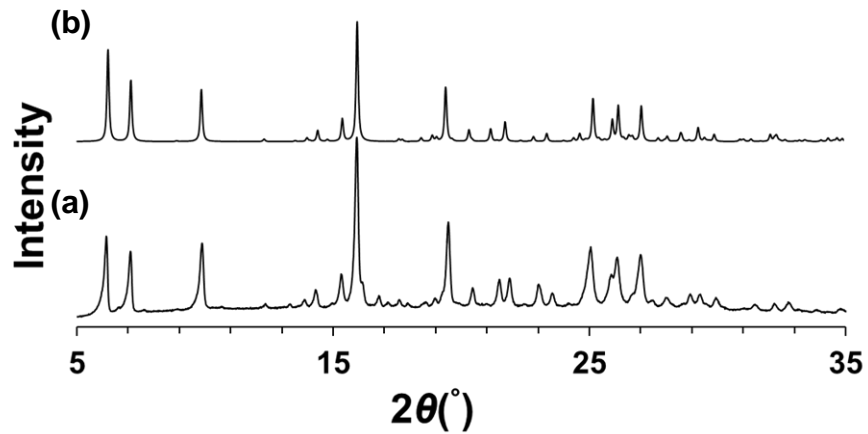


Figure 13. XRPD patterns of (a) LVFX-AMAP heated-GM and (b) simulated pattern from single crystal.

Table 1. Crystallographic data for LVFX-AMAP complex.

Empirical Formula	C ₂₆ H ₂₉ FN ₄ O ₆
Formula Weight	512.54
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ (#4)
Unit cell dimensions (°) and (Å)	<i>a</i> = 12.4196(3) <i>b</i> = 6.93510(16), <i>β</i> = 96.011(7) <i>c</i> = 14.2404(3)
Volume (Å ³)	1219.80(5)
<i>Z</i>	2
Density (calculated) (g cm ⁻³)	1.395
<i>F</i> (000)	540.00
<i>μ</i> (CuKα)(cm ⁻¹)	8.823
<i>T</i> (K)	108
Crystal size (mm)	0.368 × 0.163 × 0.120
Collected reflections	13640
Unique reflections	3989
<i>R</i> _{int}	0.0367
<i>R</i> (<i>F</i>), <i>F</i> > 2σ(<i>F</i>)	0.0320
<i>wR</i> (<i>F</i> ²), <i>F</i> > σ(<i>F</i>)	0.0859
<i>R</i> (<i>F</i>), all data	0.0353
<i>Δ</i> _r (min., max.) eÅ ⁻³	-0.27, 0.21
CCDC deposition number	1864978

Figure 14 に LVFX-AMAP 共結晶の ORTEP 図を示す。LVFX-AMAP は溶媒を含まず非対称単位に LVFX 及び AMAP が 1 分子ずつ存在していた。LVFX-AMAP 共結晶中には 3 つの水素結合が見出された (Table 2)。これまでに報告されている LVFX の水和物や塩と同様に、O4-H4A...O2 における分子内水素結合が認められた。LVFX-AMAP 共結晶中の O4-H4A 間の結合距離は 0.82 Å であり、LVFX·½H₂O (0.94-0.99Å) 及び LVFX·H₂O (0.84Å) のものとほぼ同等であった。一般に共結晶において、カルボン酸部分のヒドロキシル基は、水素結合ネットワークの形成に重要な役割を担う。多くの酸性化合物においてカルボン酸が関与する分子間での synthon は、Figure 15 に示すようなカルボン酸同士の二量体 homosynthon または heterosynthon である³⁹⁾。LVFX はこの強固な分子内水素結合の存在により、カルボキシル基が関与する一般的な synthon を形成しにくいと推察した。また LVFX と AMAP の間には 2 つの分子間水素結合、O5-H5...N3 (0.82Å) 及び N5-H4B...O3 (0.86Å) の形成が認められた。Figure 16 に既知の APAP 共結晶 (APAP-4,4'-bipyridine¹⁷⁾, APAP-oxalic acid¹⁸⁾, APAP-phenazine¹⁸⁾, APAP-2,4-pyridinedicarboxylic acid¹⁹⁾) の構造を示す。AMAP の異性体である APAP はアミド基の窒素またはカルボニル基及びヒドロキシル基を介して水素結合を形成していることが分かる。本 LVFX-AMAP 共結晶においても同様に、AMAP のアミド基の窒素及びヒドロキシル基を介して LVFX との水素結合が形成されることが示された。

LVFX-AMAP 共結晶中の LVFX のカルボキシル基の C12-O4 及び C12=O3 結合距離 (1.325 (2) 及び 1.216 (3) Å) は非等価であった。このことから、LVFX はカルボキシレートではなくカルボン酸として存在していることが示された^{39,40)}。AMAP 結晶のヒドロキシル基の O5-H5 結合距離は 0.821Å であり、LVFX-AMAP 共結晶中の AMAP の O5-H5 の結合距離 0.820Å と同様であった。以上のことから、本 LVFX-AMAP 共結晶中において、LVFX と AMAP との間にはプロトン移動がないと考えられた。Childs らは ΔpK_a (薬物及び酸の pK_a の差) が 3 以上であれば塩、0 未満であれば共結晶である可能性が高いという簡便な指標を提案し

ている。LVFXの*N*-メチル-ピペラジニル基における塩基性 pK_a (8.18)⁴¹⁾と AMAPのヒドロキシル基における弱酸性 pK_a (9.88)⁴²⁾との ΔpK_a は-1.7と負の値を示す。よって、 ΔpK_a からも LVFX と AMAP で形成される結晶は塩ではないことが確認された^{43,44)}。LVFX-AMAP間では2つの水素結合に加えて、LVFXのフッ素とAMAPの水素間のH...Fハロゲン結合の形成が示唆された。Reichenbacherらは結晶構造データベースCSDを用いて、距離(分子内及び分子間)と角度(X-H...F)の観点でH...Fハロゲン結合について分析している⁴⁵⁾。その結果、ハロゲン結合が形成された時の、H...Fの距離は2.1 Åから2.9 Å、C-H...F角は70°から180°の範囲であった。LVFX-AMAP共結晶では、AMAPのメチル基とLVFXのフッ素原子の間に形成された、C(26)...F結合の距離は3.394(3) Å、H...F間は2.53-2.65 Å及びC-H...F角は131.36°であり、LVFX-AMAP間のH...Fハロゲン結合が確認された。H...F相互作用は弱いですが、H...F相互作用の集合が結晶構造の安定化に影響を与える可能性がある。Figure 17に*b*軸に垂直な方向から見たLVFX-AMAP共結晶の結晶構造を示す。*c*軸に沿って配列した2つの水素結合O5-H5...N3とN5-H4B...O3によって形成された2次元構造は、C26-H26A...Fハロゲン結合により安定化されていた。さらに、本2次元構造は*b*軸に沿って、 π - π 相互作用(3.45 Å)と多様な水素結合により安定化され、3次元構造を形成していた。

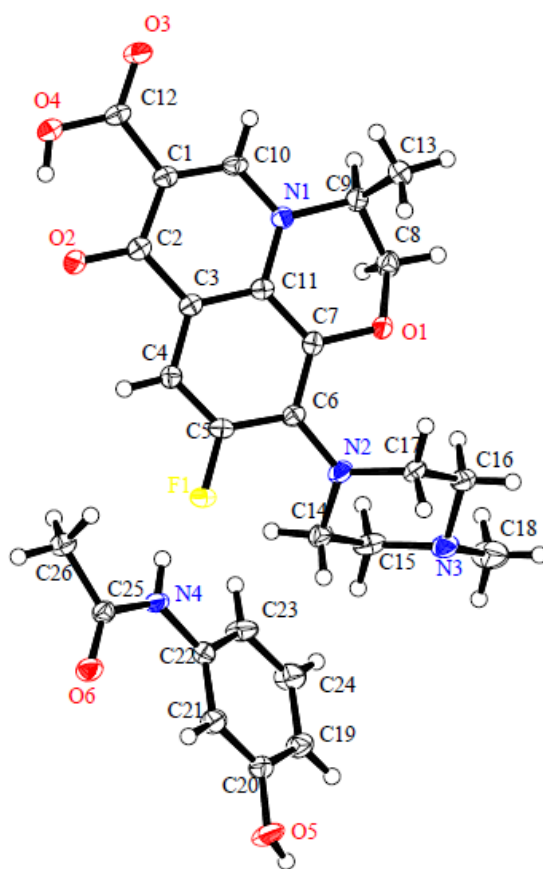


Figure 14. An ORTEP drawing of single crystal of LVFX-AMAP complex.

Table 2 Hydrogen bondings formed in LVFX-AMAP complex.

D–H···A	D–H (Å)	H···A (Å)	D···A (Å)	D–H···A (°)
O4–H4A···O2	0.82	1.75	2.511(2)	154.37
O5–H5···N3 ^a	0.82	1.94	2.739(3)	163.69
N4–H4B···O3 ^b	0.86	2.00	2.846(2)	166.01

Symmetry operators: (a) $-X, Y+1/2, -Z+1$, (b) $-X+1, Y+1/2, -Z$

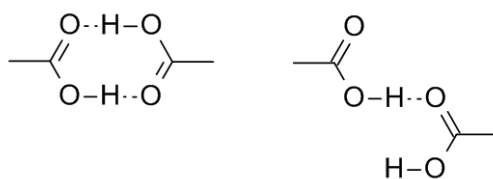


Figure 15. Hydrogen bond motifs of carboxylic acid.

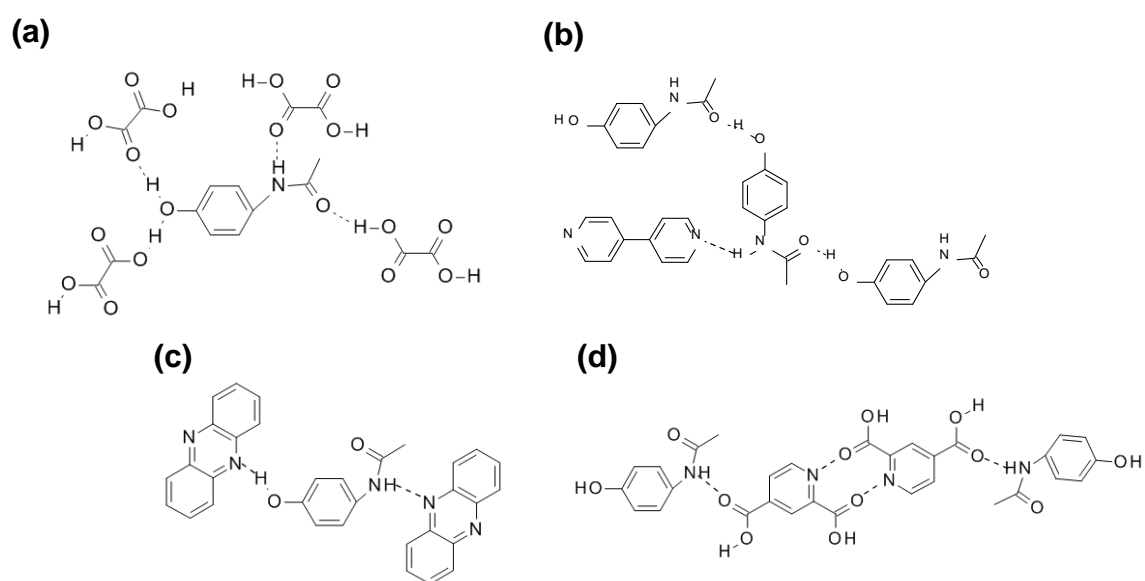


Figure 16. Crystal structures of reported APAP-coformer co-crystals in (a) APAP-4,4'-bipyridine¹⁷⁾, (b) APAP-oxalic acid¹⁸⁾, (c) APAP-phenazine¹⁸⁾, and (d) APAP-2,4-pyridinedicarboxylic acid¹⁹⁾.

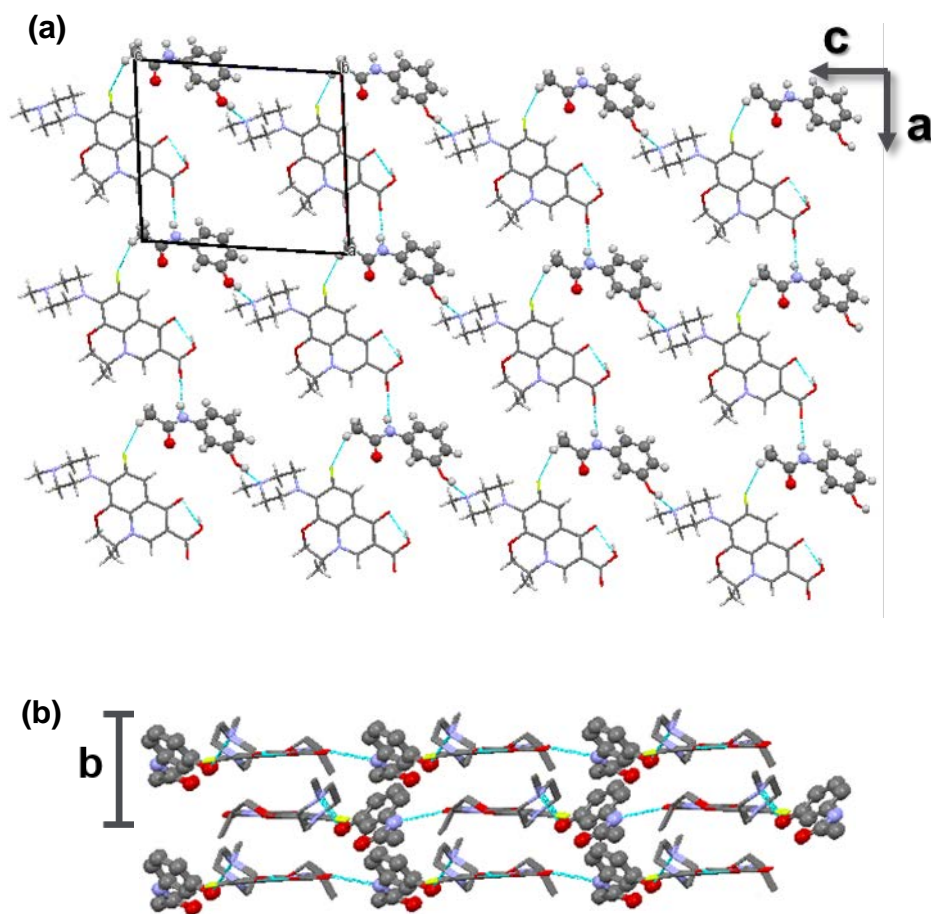


Figure 17. X-ray crystal structure of LVFX-AMAP co-crystal:(a) Packing diagrams as viewed along the *b*-axis and (b) stacked 2D sheets held together by face-to-face π - π interactions viewed along crystallographic *b*-axis.

第 2 節 LVFX-AMAP と LVFX 水和物の構造比較

LVFX-AMAP 共結晶の結晶構造を、2つの水和物(LVFX·½H₂O 及び LVFX·H₂O)の結晶構造と比較し、相違点を検討した。2つの水和物の非対称単位には2つのLVFXの配座異性体 A 及び B が存在する (Figure 18)。LVFX·½H₂O は *a* 軸 (6.88 Å) に沿って同じ配座異性体同士が配列し、~3.44 Å の面間距離でπ-π相互作用によって保持されていた (Figure 19a)。LVFX·H₂O の場合には、2つの配座異性体が交互に *b* 軸 (6.74Å) に沿って~3.37 Å の π-π 面間距離で配列していた (Figure 19b)。これらのカラム構造は最密充填配置をとり、隣接するカラムと *N*-メチルピペラジン基を介して 3 次元構造を形成していた。LVFX·½H₂O は *b* 軸に、LVFX·H₂O は *a* 軸に沿って水のチャンネルが存在する。2つの水和物は水分子と形成する水素結合の種類も異なった。LVFX·½H₂O 中の水分子は、2個の LVFX 分子の *N*-メチルピペラジン基の窒素原子との O-H…N 水素結合を介して存在していた。LVFX·H₂O 中の LVFX 分子は、*N*-メチルピペラジンの窒素原子とカルボン酸部分の酸素原子で形成された O-H…N と O-H…O 水素結合を介して水分子によって安定化されていた。一方、LVFX-AMAP 共結晶では、結晶格子への溶媒分子の取り込みは観察されなかった。非対称単位には LVFX 水和物とは異なる配座の LVFX が 1 分子存在し、*b* 軸 (6.94Å) に沿って~3.37Å の π-π 面間距離で配列し、π-π 相互作用によって安定化されていた (Figure 19c)。

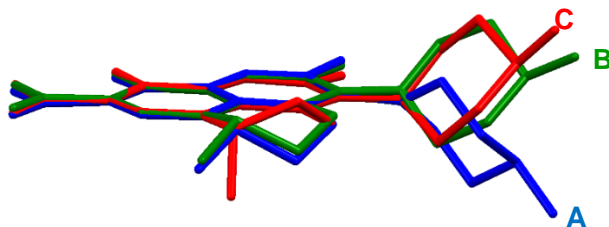


Figure 18. View of an overlay matching the backbones of the conformers A (in blue) and B (in green) of LVFX·½H₂O and LVFX·H₂O, and the conformer C (in red) of LVFX-AMAP co-crystal.

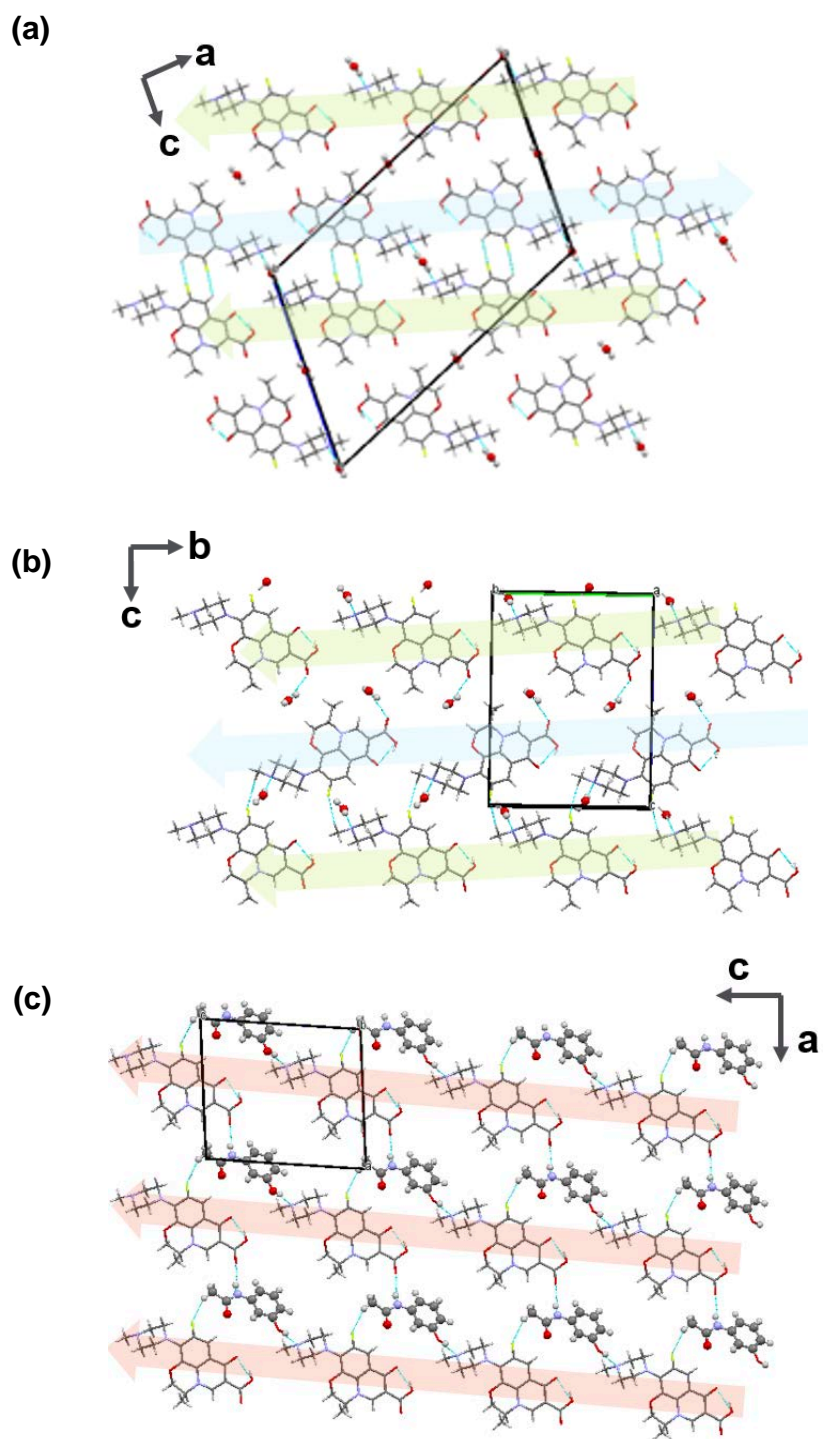


Figure 19. Packing diagrams of (a) LVFX·½H₂O, (b) LVFX·H₂O, and (c) LVFX-AMAP co-crystal.

第3節 AMAP 位置異性体の LVFX 共結晶形成に関する考察

AMAP は芳香環を介してアミド基とヒドロキシル基がメタ位に結合している。芳香族環のメタ位にヒドロキシル基を有する AMAP は LVFX と共結晶を形成したが、オルト位またはパラ位にヒドロキシル基を有する AMAP の異性体 APAP 及び AOAP は LVFX と共結晶を形成しなかった。メタ位にヒドロキシル基を有する AMAP は、水素結合を介して同じ直線上に一次元鎖状構造を形成した。一方他の2つの AMAP 異性体は、分子の歪みまたはヒドロキシル基の立体障害により、直線状に水素結合ネットワークを形成することができず、共結晶を形成しなかったと考えられた。この考察を確認するために、DFT 計算により各 AMAP 異性体と LVFX の synton のエネルギーを比較した。AMAP-LVFX 共結晶の結晶構造を基に、AMAP のヒドロキシル基の位置をオルト位、パラ位に置き換え、それぞれの異性体から成る共結晶の初期構造とした。各々について構造最適化を行った後、DFT 計算を行った。その結果、LVFX-AOAP synton のエネルギーは-17692.5181 eV、LVFX-APAP synton のエネルギーは-18074.9374 eV であるのに対して、LVFX-AMAP synton のエネルギーは-18075.4915 eV と最も安定である計算結果を得た (Table 3)。ただし、APAP との差は 0.5 eV 程度であるため、有意な差ではないと考えられる。APAP 及び AOAP でも LVFX との synton 形成の可能性はあるものの、結晶構造全体では π - π 相互作用などの寄与により LVFX-AMAP のみが共結晶を形成したと推察した。

Table 3 Total energy of LVFX-AOAP, LVFX-AMAP, and LVFX-APAP complex.

Molecule	E_{total} (eV)
LVFX-AOAP	-17692.5181
LVFX-AMAP	-18075.4915
LVFX-APAP	-18074.9374

第3章 LVFX-AMAP 共結晶の物理化学的特性

LVFX-AMAP 共結晶の原薬形態としての有用性を評価するために、溶出性、吸湿性、物理化学的安定性、及び光安定性を評価し、LVFX (LVFX \cdot ½水和物) と比較した。

第1節 LVFX-AMAP 共結晶の溶出性評価

両性イオンである LVFX の 20°C における溶解度は、pH0.5-8.4 の範囲で約 30-300 mg/mL と変化する (pH0.5 ; 約 30 mg/mL、pH2.0-5.0 ; 約 200 mg/mL、pH6.5 ; 約 300 mg/mL、pH7.5 ; 約 30 mg/mL) ⁴¹⁾。LVFX·½H₂O 及び LVFX-AMAP 共結晶について、パドル法により JP1 液 (pH1.2) 及び JP2 液 (pH6.8) 中の LVFX 溶出性を評価した (Figure 20)。LVFX·½H₂O では、試験開始から LVFX は急速に溶解し、JP1 液及び JP2 液いずれの試験液でも 95% を超える LVFX が 15 分以内に溶解した。LVFX-AMAP 共結晶についても速やかに LVFX が溶解し、AMAP との共結晶化後においても、LVFX·½H₂O の良好な溶出特性を維持することが明らかとなった。

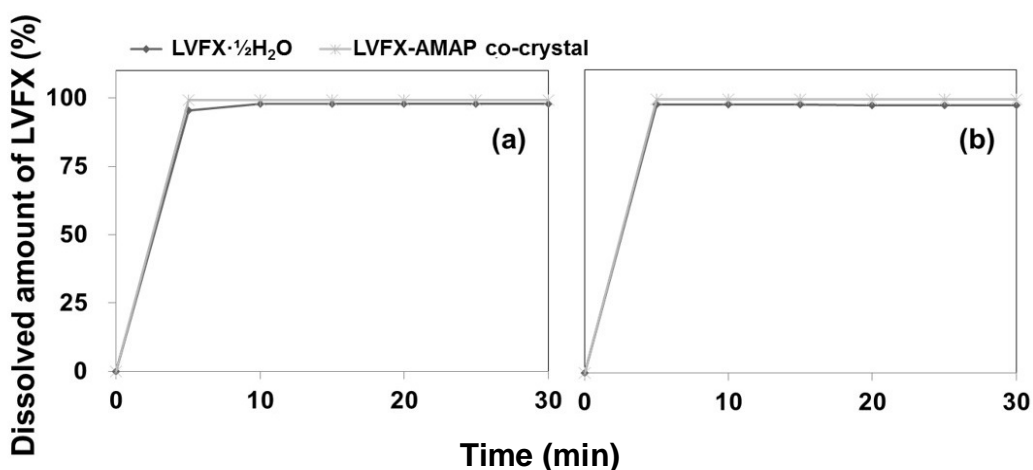


Figure 20. Dissolution profile of LVFX·½H₂O and LVFX-AMAP co-crystal in (a) Japanese Pharmacopoeia 1st fluid for dissolution test (JP1st fluid, pH1.2) and (b) Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid for disintegration test (JP2nd fluid, pH6.8) at 37°C ±0.5°C. Each point represents the mean (n = 2).

第 2 節 LVFX-AMAP 共結晶の吸湿性評価

水蒸気吸脱着測定装置を用いて、25°CにおけるLVFX·½H₂OとLVFX-AMAP共結晶の吸湿性を評価した(Figure 21)。LVFX·½H₂Oは、10%RH前後でLVFXの½水和水に相当する水蒸気の吸脱着に伴う質量変化(2.49%)を示した。このことから、10%RH前後においてLVFX無水物とLVFX·½水和水間での結晶転換が起きることが示された。一方、LVFX-AMAP共結晶は、全湿度範囲において水蒸気吸着量が少なく、95%RHにおいても0.3%以下であった。95%RHにおける水蒸気吸着は、LVFX-AMAP共結晶の結晶表面に吸着した自由水であり、LVFX-AMAP共結晶の吸湿性は極めて低いと考えられた。さらに水蒸気吸脱着測定前後のLVFX-AMAP共結晶のXRPDパターンは同様であり、その結晶形には変化は認められなかった(Figure 22)。この結果より、LVFX-AMAP共結晶形成により、LVFXの吸湿性が抑制されることが示された。LVFX·½H₂Oの結晶構造では、水分子はLVFXの*N*-メチルピペラジン基の窒素原子とO-H…Nの水素結合を形成し、LVFXの1次元鎖状構造によって形成されたチャンネル内に存在している。LVFX-AMAP共結晶においては、LVFXの*N*-メチルピペラジン基の窒素原子(N3)は、AMAPの水酸基(O5)と水素結合(O5-H5…N3)を形成している。このAMAPとの水素結合により、水分子の侵入がブロックされたため、LVFX-AMAP共結晶はLVFXと比較して低い吸湿性を示したと推察された。

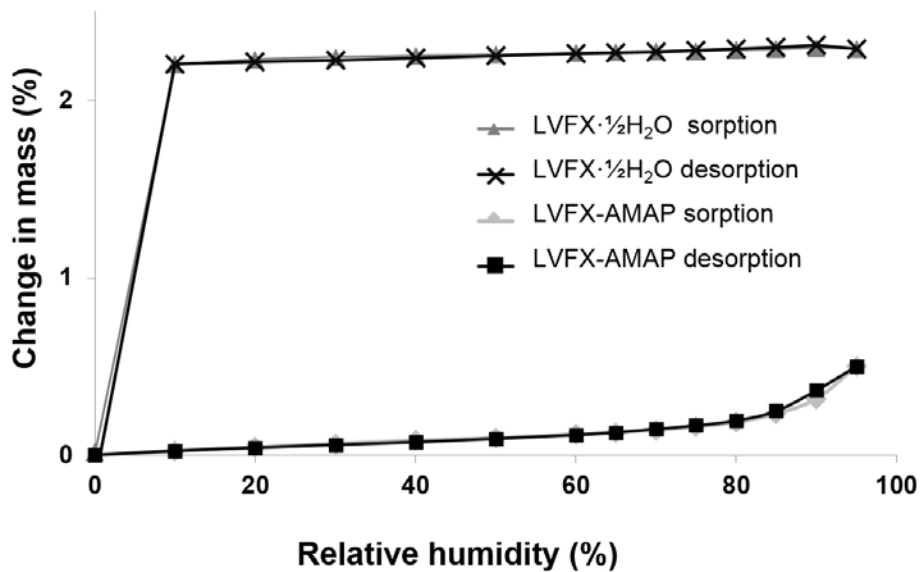


Figure 21. Water sorption/desorption isotherms of LVFX·½H₂O and LVFX-AMAP co-crystal at 25°C.

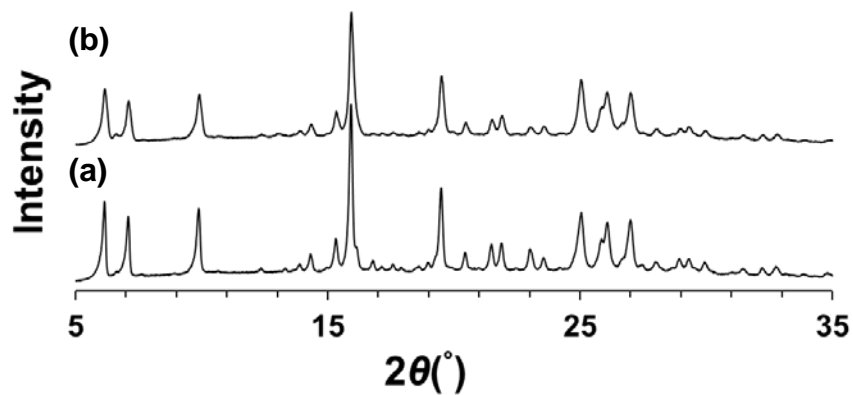


Figure 22. XRPD patterns of (a) LVFX-AMAP co-crystal and (b) LVFX-AMAP co-crystal after water sorption/desorption isotherm measurement.

第3節 LVFX-AMAP 共結晶の物理的及び化学的安定性

原薬形態の選定において、保存安定性に優れた結晶形を選択することは、製造、品質管理、及びレギュレーションの観点から重要である⁴⁶⁾。LVFX·½H₂O 及び LVFX-AMAP 共結晶について物理的及び化学的安定性試験を行った。化学的安定性としては、試料を各温度・湿度条件で4週間保存し、生成した不純物の量を評価した。LVFX·½H₂O では、いずれの保存条件でも不純物量の増加率は0.03%未満であった (Figure 23)。また、LVFX-AMAP 共結晶における保存後の不純物量の増加率は0.02%未満であった。以上より、今回用いた条件においては、LVFX-AMAP 共結晶の化学的安定性は、LVFX·½H₂O と同様に高いことが示された。

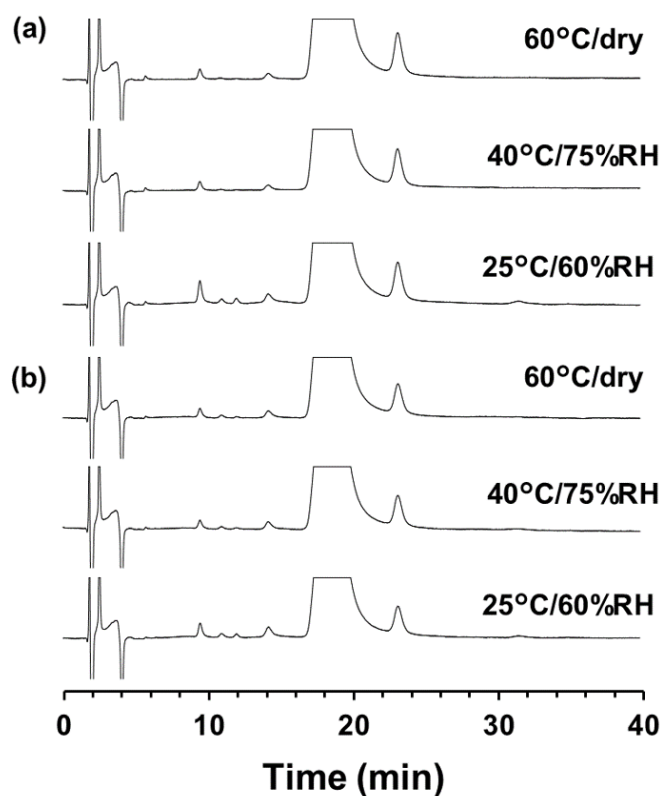


Figure 23. HPLC chromatograms of (a) LVFX·½H₂O and (b) LVFX-AMAP co-crystal stored at each stressed condition for 4 weeks.

次に物理的安定性試験として、同温度・湿度条件で 4 週間保存した試料について、XRPD 測定を行い、保存による結晶形の変化を評価した (Figure 24)。LVFX·½H₂O においては、25°C/60%RH 及び 40°C /75%RH で保存した試料の XRPD パターンは保存前と同様であった (Figure 24a)。一方、60°C/dry で保存した試料では、LVFX·½H₂O に由来する回折ピークに加えて、LVFX 無水物 δ 形の結晶形に由来する回折ピークが観察された。Gorman らは、乾燥条件で脱水した LVFX (γ 形) を 54°C 以下に冷却すると、LVFX 無水物 γ 形が LVFX 無水物 δ 形に結晶転移することを報告している¹⁴⁾。60°C での保存時に LVFX·½H₂O は脱水し、LVFX 無水物 γ 形に変化したと考えられた。その後、XRPD 測定前に室温下に戻した際、LVFX 無水物 γ 形の一部が LVFX 無水物 δ 形に転換したと考えられた。一方、LVFX-AMAP 共結晶では、すべての保存条件で XRPD パターンに変化は認められなかった (Figure 24b)。従って、60°C/dry 条件においては、LVFX-AMAP 共結晶は LVFX·½H₂O と比較して物理的安定性が高いことが明らかとなった。

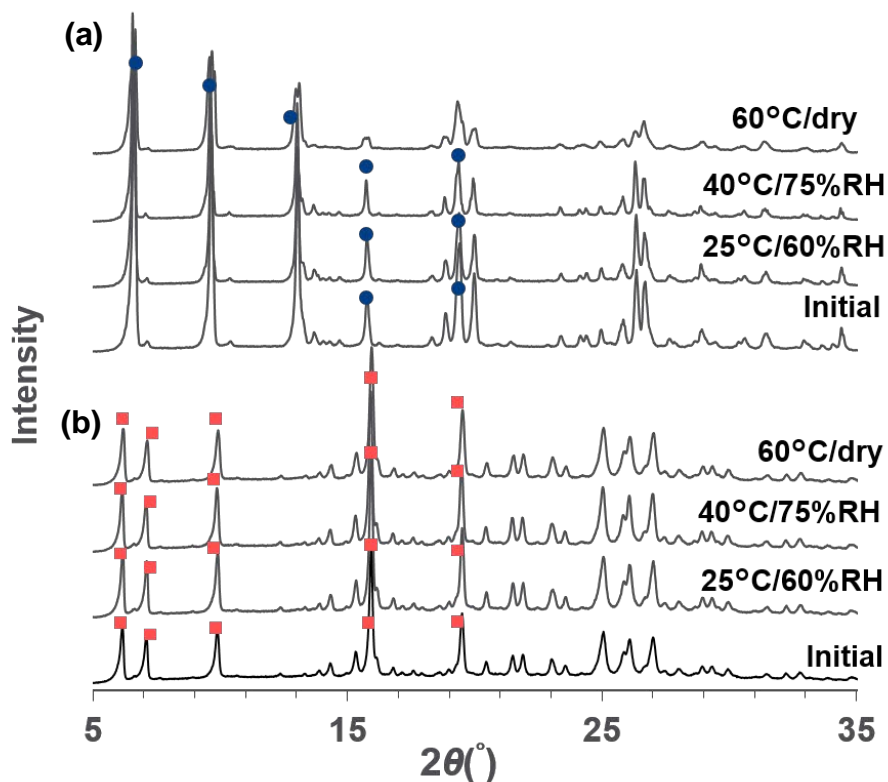


Figure 24. XRPD patterns of (a) LVFX·½H₂O and (b) LVFX-AMAP co-crystal stored at each stressed condition for 4 weeks. (blue circle and pink square marks in the figure represent the LVFX·½H₂O and LVFX-AMAP cocrystal, respectively)

第4節 LVFX-AMAP 共結晶の光安定性

フルオロキノロン系合成抗菌薬には、その副作用として光線過敏症などの光毒性がある⁴⁷⁾。フルオロキノロン薬の光線過敏症は、光酸化反応で生成する分解物がウシ血清アルブミンに共有結合することに起因する。さらに表皮細胞が光分解生成物に結合し、光アレルギーを引き起こす。LVFX溶液の光分解研究において、脱メチル体、ジアミン体、脱フルオロ体、脱ホルミル体、及びN-オキシド体など複数の分解生成物が同定されている⁴⁸⁾。光分解速度は、溶液のpH、誘電率、及び粘度などの溶媒特性により異なる⁴⁹⁾。本研究では、AMAPとの共結晶化がLVFXの光安定性に与える影響を評価するために、経口剤を想定した固体状態、注射剤を想定した溶液、及び懸濁液状態におけるLVFX・½H₂O とLVFX-AMAP共結晶の光安定性を比較した。初めに、固体状態の光安定性の検討として、120万lx・h保存前後の粉末試料について目視 (Figure 25) 及び色差 (ΔE^*_{ab} 、Table 4) による評価を行った。LVFX・½H₂Oは、保存前は淡黄白色を示したが、保存後は暗淡黄白色に変化した。保存前後のLVFX・½H₂Oの ΔE^*_{ab} 値は、18.2 (L^* 、 a^* 、 b^* = -9.46、-6.67、14.01) 及び34.5 (L^* 、 a^* 、 b^* = -24.03、-1.89、24.64) であった。LVFX-AMAP共結晶は、保存前は白色であったが、保存後は淡黄白色～黄色を示した。LVFX-AMAP共結晶の保存前後の ΔE^*_{ab} 値は、17.3 (L^* 、 a^* 、 b^* = -10.5、-4.19、14.06) 及び24.9 (L^* 、 a^* 、 b^* = 18.8、-2.5、17.6) であった。LVFX・½H₂O及びLVFX-AMAP共結晶の保存前後の色差 ΔE^*_{ab} の変化量はそれぞれ15.9及び7.6であった。このことから、どちらの試料でも経時的に着色傾向が認められたものの、LVFX-AMAP共結晶ではLVFX・½H₂Oと比較して色差変化は小さいことが確認された。



Figure 25. Sample appearances of (a-b) LVFX·½H₂O and (c-d) LVFX-AMAP co-crystal. (a, c) and (b, d) is the samples before and after irradiation 1.2 million lx·h, respectively.

LVFX においては、カルボン酸及び 3 級アミンに基づく解離平衡が存在し、それぞれの pK_a は 6.11 及び 8.18 と算出されている⁴¹⁾。LVFX は両性イオンを形成し、中性付近で分解が最も早く進行する。そこで、pH7.4 の Britton-Robinson 緩衝液を用いて、溶液及び懸濁液状態における LVFX·½H₂O と LVFX-AMAP 共結晶の光安定性について検討した。光安定性試験では、60 万あるいは 120 万 lx·h 保存時における LVFX、主要な光分解経路の初期分解生成物である *N*-オキシド体、及び総不純物量を評価した (Table 4)。なお、LVFX 量は保存前の初期値を 100% として正規化した値を示す。Figure 26 に保存前後の溶液及び懸濁液のクロマトグラムを示す。各クロマトグラムで観察された LVFX 分解生成物は以下の通りである：脱メチル体 (Deg. 2)、ジアミン体 (Deg. 3)、脱フルオロ体 (Deg. 4)、及び *N*-オキシド体 (Deg. 5)。LVFX·½H₂O 溶液では 60 万 lx·h 時点で LVFX の含量が 2.6% まで低下したのに対して、LVFX-AMAP 共結晶溶液中では 25.8% まで抑制された。また、LVFX·½H₂O 懸濁液では 120 万 lx·h 時点での LVFX の含

量は 65.0%であったのに対して、LVFX-AMAP 共結晶懸濁液中の LVFX 含量は 87.7%であった。これらの結果から、固体、溶液、及び懸濁液状態のいずれの場合でも AMAP との共結晶形成により LVFX の光安定性が改善することが明らかとなった。N-オキサイド体の生成量に着目すると、LVFX·½H₂O 溶液では 60 万 lx·h 時点で 10.2%生成したのに対して、LVFX-AMAP 共結晶溶液中では 0.4%未満に抑制された。また、LVFX·½H₂O 懸濁液では 120 万 lx·h 時点で N-オキサイド体が 1.8%生成したのに対して、LVFX-AMAP 共結晶では N-オキサイド体の生成は認められなかった。LVFX は N-メチル基の窒素が非共有電子対を有しており、光酸化反応において LVFX N-オキサイド体が生成する。しかし、AMAP と共結晶化することで、この非共有電子対が AMAP のヒドロキシル基との相互作用に用いられる。その結果、N-オキサイド体の生成が抑えられ、光安定性が改善したと考察した。

Table 4 Photostability of LVFX·½H₂O and LVFX-AMAP co-crystal in solid- solution- and suspended-state.

Sample			Condition		
			Initial	0.6 million lx·h	1.2 million lx·h
LVFX·½H ₂ O	in solid state	ΔE*ab	18.6	Not tested	34.5
		Assay (%)	100	2.6	Not tested
	in solution state	Impurities (%)			
		LVFX- <i>N</i> -oxide (Deg.5)	0.0	10.2	Not tested
		Total	0.7	94.9	Not tested
	in suspended state	Assay (%)	100	88.4	65.0
		Impurities (%)			
		LVFX- <i>N</i> -oxide	0.0	0.7	1.8
		Total	0.2	6.0	21.9
LVFX-AMAP co-crystal	in solid state	ΔE*ab	17.3	Not tested	24.9
		Assay (%)	100.0	25.8	Not tested
	in solution state	Impurities (%)			
		LVFX- <i>N</i> -oxide	0.0	0.4	Not tested
		Total	0.3	58.2	Not tested
	in suspended state	Assay (%)	100.0	92.2	87.7
		Impurities (%)			
		LVFX- <i>N</i> -oxide (Deg.5)	0.0	0.0	0.0
		Total	0.3	3.1	8.5

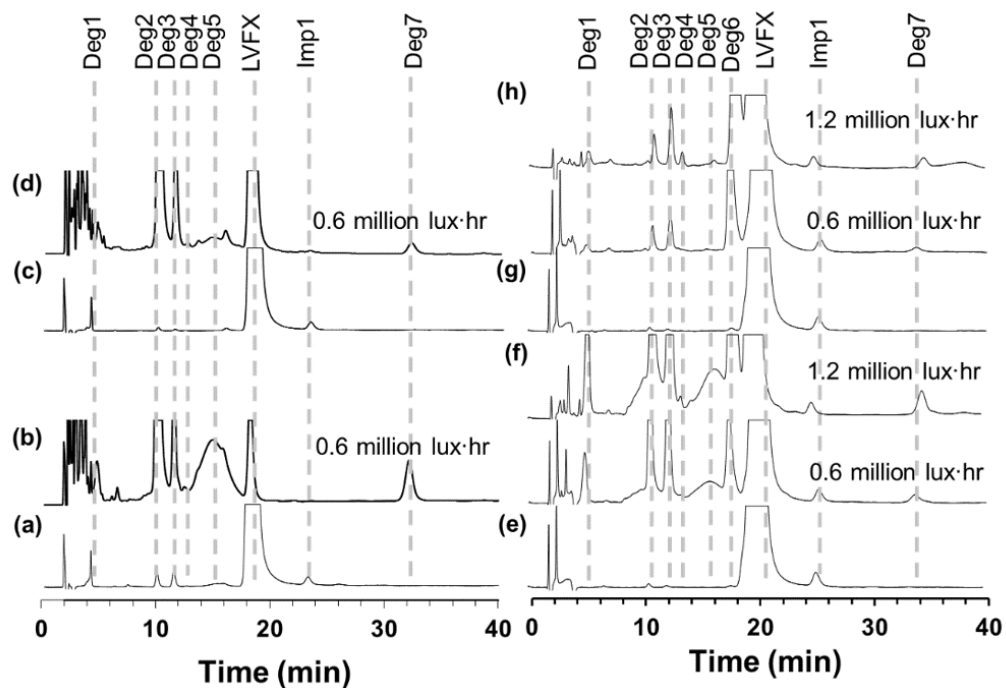


Figure 26. HPLC chromatograms of (a) LVFX·½H₂O solution before irradiation, (b) LVFX·½H₂O solution after irradiation, (c) LVFX-AMAP co-crystal solution before irradiation, (d) LVFX-AMAP co-crystal solution after irradiation, (e) LVFX·½H₂O suspension before irradiation, (f) LVFX·½H₂O suspension after irradiation, and (g) LVFX-AMAP co-crystal suspension before irradiation, (h) LVFX-AMAP co-crystal suspension after irradiation.

結語

第一章では、これまで単結晶構造の報告のなかったニューキノロン系合成抗菌薬 LVFX 共結晶の調製を行った。LVFX と同時に処方されることが多い解熱鎮痛薬 APAP とその類縁体 9 種を coformer として用いて、粉碎と加熱による薬物-薬物 共結晶スクリーニング検討を行った。その結果、LVFX-AMAP モル比 1:1 の新規共結晶を得ることに成功した。本共結晶は水和数の異なる LVFX ($\text{LVFX}\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 及び $\text{LVFX}\cdot\text{H}_2\text{O}$) どちらを用いた場合でも調製できることを確認した。また、IR 測定の結果から共結晶中において、LVFX と AMAP の間に N-H (AMAP) \cdots O(LVFX) の水素結合形成が示唆された。

第二章では単結晶 X 線構造解析により構造評価を行った。LVFX-AMAP 共結晶は、良溶媒としてアセトニトリル、貧溶媒としてデカンを用いることで調製できた。構造解析の結果、本結晶は無水物であり、LVFX と AMAP が水素結合を形成していることから塩ではなく共結晶であることを確認した。共結晶中の LVFX は LVFX 単独で形成しているカルボキシル基の分子内水素結合を維持したまま AMAP のアミド基と水素結合を形成していることが明らかとなった。また、共結晶と LVFX 水和物との構造比較より、両者の間で LVFX の配座や充填様式が異なることを示した。さらに、AMAP 位置異性体である AMAP と AOAP が共結晶を形成しない理由について、LVFX-AMAP 共結晶の構造に基づいて考察した。

第三章では本共結晶の物理化学的特性として溶出性、吸湿性、温湿度に対する物理化学的安定性、及び光安定性を評価した。本共結晶は LVFX の良好な溶出性及び温湿度に対する化学的安定性を保持したまま、吸湿性、温湿度に対する物理的安定性及び光安定性が向上しており、医薬品原薬として優れた物性を有した結晶であることが明らかとなった。

本研究により LVFX 共結晶の単結晶構造解析に初めて成功し、その構造的特徴を明らかとした。共結晶の調製に加熱法を選択することで、室温環境下では

速やかに水和する LVFX についても、無水物の共結晶を調製できることを見出した。これまでに共結晶形成により薬物の光安定性を改善した報告は限られており、本研究は共結晶形成による新しい利点を示すものである。今後の医薬品開発において、共結晶研究は益々重要視されていくと考えられる。本研究で得られた知見が、共結晶研究発展の一助になることが期待される。

謝辞

本研究において終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました恩師 千葉大学大学院薬学研究院 教授 森部久仁一先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始有益なる御指導と御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 准教授 東頭二郎先生に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えていただき、貴重な御支援を賜りました第一三共株式会社 分析評価研究所所長 大原求氏、製剤技術研究所所長 安藤秀一博士ならびに分析評価研究所 研究第 5 グループ長 小野誠博士に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、種々の御協力をいただきました第一三共 RD ノバーレ株式会社 合成化学研究部 構造化学グループ主任研究員 鈴木誠氏に心から感謝の意を表します。

本研究完成に至るまで、終始有益なる御指導ならびに御助言を賜りました第一三共株式会社 CMC 企画部 CMC 第 1 グループ課長代理 浜田義人博士、分析評価研究所 研究第 1 グループ主任研究員 鈴木徹也博士、研究第 5 グループ主任研究員 小林克弘博士ならびに江上晶子氏に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、終始御助言、ご協力をいただきました第一三共株式会社 分析評価研究所、製剤技術研究所の諸氏ならびに千葉大学大学院薬学研究院 製剤工学研究室の皆様心から感謝いたします。

最後に、終始温かく見守って下さいました両親ならびに夫、息子 樹也、娘 翠咲に感謝します。

参考文献

1. Food and Drug Administration. 2018. Guidance for Industry: Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals Guidance for Industry.
2. European Medicines Agency. 2014. Reflection paper on the use of cocrystals and other solid state forms of active substances in medicinal products.
3. FDA. 2013. GRAS notice inventory. Food and Drug Administration. Available at:
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=graslisting>
4. Évora AO, Castro RA, Maria TM, Rosado MT, Ramos Silva M, Matos Beja A, Canotilho J, Eusébio ME. 2011. Pyrazinamide-diflunisal: a new dual-drug co-crystal. *Cryst Growth Des* 11:4780–4788.
5. Jiang L, Huang Y, Zhang Q, He H, Xu Y, Mei X. 2014. Preparation and solid-state characterization of dapsone drug-drug co-crystals. *Cryst Growth Des* 14:4562–4573.
6. Umeda Y, Fukami T, Furuishi T, Suzuki T, Tanjoh K, Tomono K. 2009. Characterization of multicomponent crystal formed between indomethacin and lidocaine. *Drug Dev Ind Pharm* 35:843–851.
7. Grobelny P, Mukherjee A, Desiraju GR. 2011. Drug-drug co-crystals: temperature-dependent proton mobility in the molecular complex of isoniazid with 4-aminosalicylic acid. *Cryst Eng Comm* 13:4358–4364.
8. Thipparaboina R, Kumar D, Chavan RB, Shastri NR. 2016. Multidrug co-crystals: towards the development of effective therapeutic hybrids. *Drug Discov Today* 21:481–490.
9. Duggirala NK, Perry ML, Almarsson Ö, Zaworotko MJ. 2016. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. *Chem Commun.* 52:640-55.
10. Almansa C, Mercè R, Tesson N, Farran J, Tomàs J, Plata-Salamán CR. 2017. Co-crystal of tramadol hydrochloride–celecoxib (ctc): a novel API–API co-

- crystal for the treatment of pain. *Cryst Growth Des* 17:1884–1892.
11. Drlica K. 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* 2:504–508.
 12. Hooper DC. 1999. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs* 58:6–10.
 13. Kitaoka H, Wada C, Moroi R, Hokusui H. 1995. Effect of dehydration on the formation of levofloxacin pseudopolymorphs. *Chem Pharm Bull* 43:649–653.
 14. Gorman EM, Samas B, Munson EJ. 2012. Understanding the dehydration of levofloxacin hemihydrate. *J Pharm Sci* 101:3319–3330.
 15. Singh SS, Thakur TS. 2014. New crystalline salt forms of levofloxacin: conformational analysis and attempts towards the crystal structure prediction of the anhydrous form. *Cryst Eng Comm* 16:4215–4230.
 16. Freitas JTJ, de Melo CC, Viana OMMS, Ferreira FF, Doriguetto AC. 2018. Crystal structure of levofloxacin anhydrides: a high-temperature powder X-ray diffraction study versus crystal structure prediction. *Cryst Growth Des* 18:3558–3568.
 17. Oswald ID, Allan DR, McGregor PA, Motherwell WS, Parsons S, Pulham CR. 2002. The formation of paracetamol (acetaminophen) adducts with hydrogen-bond acceptors. *Acta Crystallogr B*: 58:1057-1066.
 18. Karki S, Frišćić T, Fabian L, Laity PR, Day GM, Jones W. 2009. Improving mechanical properties of crystalline solids by cocrystal formation: new compressible forms of paracetamol. *Adv Mater* 21:3905-3909.
 19. Sander JR, Bučar DK, Henry RF, Baltrusaitis J, Zhang GG, MacGillivray LR. 2010. A red zwitterionic co-crystal of acetaminophen and 2, 4 - pyridinedicarboxylic acid. *J Pharm Sci* 99:3676-3683.
 20. Ahmed H, Shimpi MR, Velaga SP. 2017. Relationship between mechanical properties and crystal structure in cocrystals and salt of paracetamol. *Drug Dev Ind Pharm* 43:89-97.

21. Xie Y, McGill MR, Du K, Dorko K, Kumer SC, Schmitt TM, Ding WX, Jaeschke H. 2015. Mitochondrial protein adducts formation and mitochondrial dysfunction during *N*-acetyl-*m*-aminophenol (AMAP)-induced hepatotoxicity in primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharm* 289:213–222.
22. Rottero AE, Kissinger P. 1987. Detection and identification of three thioether conjugates of 2-hydroxyacetanilide by liquid chromatography/electrochemistry. *Biomed Chromatogr* 2:24–29.
23. Childs S L, Hardcastle K I. 2007. Cocrystals of piroxicam with carboxylic acids. *Cryst Growth Des* 7:1291-1304.
24. Childs S. L, Rodrigues-Hornedo N, Reddy L S, Jayasanker A, Maheshwari C, McCausland L, Shipplett R, Stahly B C. 2008. Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine. *Cryst Eng Comm* 10:856-864.
25. Takata N, Shiraki K, Takano R, Hayashi Y, Terada K. 2008. Cocrystal screening of stanolone and mestanolone using slurry crystallization. *Cryst Growth Des* 8:3032-3037.
26. Trask A. V, Samuel Motherwell W D, Jones W. 2005. Pharmaceutical cocrystallization: engineering a remedy for caffeine hydration. *Cryst Growth Des* 5:1013-1021.
27. Trask A V, Streek J, Samuel Motherwell W D, Jones W. 2005. Achieving polymorphic and stoichiometric diversity in cocrystal formation: Importance of solid-state grinding, powder X-ray structure determination, and seeding. *Cryst Growth Des* 5:2233-2241.
28. Friščić T, Jones W. 2009. Recent advances in understanding the mechanism of cocrystal formation via grinding. *Cryst Growth Des* 9:1621-1637.
29. Friščić T, Fabian L, Burley JC, Jones W, Motherwell WS. 2006. Exploring cocrystal–cocrystal reactivity via liquid-assisted grinding: the assembling of

- racemic and dismantling of enantiomeric cocrystals. *Chem Comm* 48:5009-5011.
30. Berry D J, Seaton C C, Clegg W, Harrington R W, Coles S J, Horton P N, Hursthouse M B, Storey R, Jones W, Frii T, Blagden N. 2008. Applying hot-stage microscopy to co-crystal screening: A study of Nicotinamide with seven active pharmaceutical ingredients. *Cryst Growth Des* 8:1697-1712.
 31. Yamashita H, Hirakura Y, Yuda M, Teramura T, Terada K. 2013. Detection of cocrystal formation based on binary phase diagrams using thermal analysis. *Pharm Res.* 30:70-80.
 32. Yamashita H, Hirakura Y, Yuda M, Terada K. 2014. Coformer screening using thermal analysis based on binary phase diagrams. *Pharm Res* 31:1946-1957.
 33. Bandari S, Dronam VR, Eedara BB. 2017. Development and preliminary characterization of levofloxacin pharmaceutical cocrystals for dissolution rate enhancement. *J Pharm Investig* 47:583–591.
 34. Groom CR, Bruno IJ, Lightfoot MP, Ward SC. 2016. The Cambridge structural database. *Acta Crystallogr B* 72:171–179.
 35. Lu E, Rodri'guez-Hornedo N, Suryanarayanan R. 2008. A rapid thermal method for cocrystal screening. *Cryst Eng Comm* 10:665–668.
 36. Dorofeev VL. 2004. Infrared spectra and the structure of drugs of the fluoroquinolone group. *Pharm Chem J* 38:693–697.
 37. Mittal SK, Sharma R, Narang P. 2017. A green electroanalytical method for the determination of levofloxacin by ion-pair formation with picric acid. *J Anal Pharm Res* 4:00116.
 38. Sultana N, Arayne MS, Rizvi SB, Haroon U, Mesaik MA. 2013. Synthesis, spectroscopic, and biological evaluation of some levofloxacin metal complexes. *Med Chem Res* 22:1371–1377.
 39. Zhou L, Dodd S, Capacci-Daniel C, Garad S, Panicucci R, Sethuraman V. 2016. Co-crystal formation based on structural matching. *Eur J Pharm Sci* 88:191-201.

40. Stilinović V, Kaitner B. 2006. Salts and co-crystals of gentisic acid with pyridine derivatives: the effect of proton transfer on the crystal packing (and vice versa). *Cryst Growth Des* 12:5763–5772.
41. 第一三共株式会社. 2018. レボフロキサシン錠インタビューフォーム
42. PubChem Compound Database; CID = 12124. Available at: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/metacetamol#section=Top>. Accessed 25 November 2018
43. Childs SL, Stahly GP, Park A. 2007. The salt-cocrystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state. *Mol Pharm* 4:323–338.
44. Cruz-Cabeza AJ. 2012. Acid–base crystalline complexes and the pKa rule. *Cryst Growth Des* 14:6362–6365.
45. Reichenbacher K, Süß HI, Hulliger J. 2005. Fluorine in crystal engineering—“the little atom that could”. *J Chem Soc Rev* 34:22–30.
46. Kojima T, Sugano K, Onoue S, Murase N, Sato M, Kawabata Y, Mano T. Solid form selection of zwitterionic 5-HT₄ receptor agonist. 2008. *Int J Pharm* 350:35–42.
47. Tokura Y, Nishijima T, Yagi H, Furukawa F, Takigawa M. 1996. Photohaptenic properties of fluoroquinolones. *Photochem Photobiol* 64:838–844.
48. Yoshida Y, Sato E, Moroi R. 1993. Photodegradation products of levofloxacin in aqueous solution. *Arzneim-Forsch* 43:601–606.
49. Ahmad I, Bano R, Sheraz MA, Ahmed S, Mirza T, Ansari SA. 2013. Photodegradation of levofloxacin in aqueous and organic solvents: a kinetic study. *Acta Pharm* 63:223–229.

論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

T. Shinozaki, M. Ono, K. Higashi, K. Moribe, A novel drug–drug co-crystal of levofloxacin and metacetamol: Reduced hygroscopicity and improved photostability of levofloxacin, *J. Pharm. Sci.*, in press

本学位論文の審査は千葉大学大学院医学薬学府で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院薬学研究院教授 薬学博士 戸井田 敏彦

副査 千葉大学大学院薬学研究院教授 薬学博士 秋田 英万

副査 千葉大学大学院薬学研究院教授 薬学博士 伊藤 晃成