

学位論文（博士）

迅速な安定性予測を目的とした医薬品の  
分解機構と分解速度に関する研究

2020年9月

星薬科大学大学院 薬学研究科

総合薬科学専攻

薬品物理化学

学籍番号 DS782

田村 幸介

## 目次

論文リスト .....	i
略号リスト .....	ii
緒言 .....	1
第一章: 新規タキサン化合物 DS80100717 の化学的安定性評価及び分解機構 .....	5
1. 要旨 .....	5
2. 緒言 .....	5
3. 実験 .....	7
4. 測定 .....	9
5. 結果及び考察 .....	11
6. 結論 .....	25
第二章: ステアリン酸マグネシウム含量が薬物分解速度に及ぼす影響と拡張型アレニウス式を用いたモデル化 .....	26
1. 要旨 .....	26
2. 緒言 .....	26
3. 実験 .....	28
4. 測定 .....	30
5. 結果及び考察 .....	31
6. 結論 .....	45
総括 .....	46
謝辞 .....	47
引用文献 .....	48

## 論文リスト

本学位論文は学術誌に掲載された以下の論文をもとに作成したものである。

### 主論文

- 1) Degradation Pathway of a Taxane Derivative DS80100717 Drug Substance and Drug Product.: K.Tamura, M.Ono, T.Kawabe, M.Ohara, and E.Yonemochi, Chem. Pharm. Bull., 68, 392-397 (2020).  
(第一章)
  
- 2) Impact of Magnesium Stearate Content: Modeling of Drug Degradation Using a Modified Arrhenius Equation.: K.Tamura, M.Ono, T.Kawabe, and E.Yonemochi, Chem. Pharm. Bull., accepted, (2020).  
(第二章)

## 略号リスト

本論文では以下の略号を用いた。

<i>A</i>	: 頻度因子
ASAP	: Accelerated Stability Assessment Program、短期安定性評価プログラム
<i>B</i>	: 湿度に影響する因子
<i>C</i>	: ステアリン酸マグネシウム含有量に影響する因子
<i>E<sub>a</sub></i>	: 活性化エネルギー
ESI	: Electrospray ionization、エレクトロスプレーイオン化法
HCl	: Hydrochloric acid、塩酸
H/D	: Hydrogen-Deuterium、水素-重水素
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hydrogen peroxide、過酸化水素
HPLC	: High performance liquid chromatography、高速液体クロマトグラフィー分析法
ICH	: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use、医薬品規制調和国際会議
<i>k</i>	: 反応速度定数
<i>k<sub>obs</sub></i>	: 擬一次反応速度定数
LC-MS	: Liquid chromatography-mass spectrometry、液体クロマトグラフィー-質量分析法
LC-MS/MS	: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法
LC-PDA	: Liquid chromatography-photodiode array、液体クロマトグラフィー-フォトダイオードアレイ分析法
Ln	: 自然対数
MgSt	: Magnesium stearate、ステアリン酸マグネシウム
NaOH	: Sodium hydroxide、水酸化ナトリウム
NMR	: Nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴分光法
NOESY	: <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H nuclear Overhauser effect spectroscopy、 <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H 核オーバーハウザ

一効果相関

PDA	: Photodiode array、フォトダイオードアレイ
PXRD	: Powder X ray diffraction、粉末 X 線回折
$R$	: 気体定数
$R^2$	: 決定係数
RMSE	: Root mean squared error、二乗平均平方根誤差
RH	: Relative humidity、相対湿度
RRT	: Relative retention time、相対保持時間
$T$	: 絶対温度

## 緒言

医薬品は製造から保管及び流通まで一貫して品質を保証する必要があり、温度、湿度、酸素、及び光など曝露が想定される環境要因下での安定性の推移を把握することは医薬品開発において重要である。医薬品の原薬及び製剤の承認申請時には、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）の「新有効成分含有医薬品の原薬及び製剤の承認申請の安定性に関するガイドライン」Q1A(R2)<sup>1)</sup>や Q1B<sup>2)</sup>に準拠して安定性試験結果を提出する事が求められている。加えて、ICH Q1A(R2)に準拠して安定性試験を実施するにあたり、原薬の分解生成物の取り扱いは ICH Q3A(R2)<sup>3)</sup>、製剤は ICH Q3B(R2)<sup>4)</sup>でそれぞれ不純物管理の閾値が定められている。例として、構造決定が必要になる分解生成物の閾値について、原薬分解生成物を Table 1 に、製剤分解生成物を Table 2 に示す。分解生成物が閾値を超えるかどうかは、承認申請時における保存条件、包装形態、及び最終処方での長期安定性試験の結果から判断する。

医薬品開発においては開発段階毎の研究結果や費用試算に基づき、原薬及び製剤の製法や処方の変更が計画されるため、長期安定性試験の結果を待っている製品改良のタイミングを逸してしまう。一般的な室温保存を想定した長期安定性試験（25 °C/60% RH）に対して、加速試験（40 °C/75% RH）や苛酷試験の短期間のデータからの外挿には、湿度の影響を考慮していないなど限界がある。更に画期的な新薬を早期に患者さんに届けるために、医薬品の開発期間や審査期間を大幅に短縮できる日米欧の迅速審査制度（先駆け審査指定制度、Breakthrough Therapy Designation、及び Priority Medicines）<sup>5)</sup>が各規制当局から提示されているが、従来のガイドラインに沿った安定性試験を実施するだけでは製品の品質理解が不十分であり、本制度に沿った開発期間の短縮には対応できない。従って、加速試験や苛酷試験など短期安定性試験から長期安定性試験を精度良く予測し、医薬品の製品設計に反映する事が現在の安定性試験に求められている。

**Table 1 Identification Thresholds for Impurities in New Drug Substances**

1日最大投与量 <sup>a</sup>	構造決定に必要な閾値 <sup>b</sup>
≤ 2g	0.10%又は1日摂取量 1.0mg (どちらか低い方)
> 2g	0.05%

<sup>a</sup> 1日当たりの原薬の摂取量

<sup>b</sup> 毒性の非常に強い不純物については、これよりも低い閾値が適当な場合もある。

**Table 2 Identification Thresholds for Impurities in New Drug Products**

1日最大投与量 <sup>a</sup>	構造決定に必要な閾値 <sup>b,c</sup>
< 1mg	1.0%あるいは1日総摂取量 5 µg のいずれか低い方
1 mg – 10 mg	0.5%あるいは1日総摂取量 20 µg のいずれか低い方
> 10 mg- 2 g	0.2%あるいは1日総摂取量 2 mg のいずれか低い方
> 2 g	0.10%

<sup>a</sup> 1日当たりの原薬の摂取量

<sup>b</sup> 分解生成物の閾値は、原薬中に含まれる分解生成物の百分率、あるいは分解生成物の1日総摂取量 (TDI) で表されている。分解生成物の毒性が非常に強い場合には、これより低い閾値を用いるのが適切であろう。

<sup>c</sup> これより高い閾値を用いる場合は、その科学的妥当性を示すこと。

また近年では潜在的発がんリスクのある変異原性不純物の医薬品への混入が問題となっており、ヘパリンナトリウム製剤への過硫酸化型コンドロイチン硫酸の混入<sup>6)</sup>、Nelfinavir mesylate へのメタンスルホン酸エチルの混入<sup>7)</sup>、サルタン系医薬品への *N*-ニトロソジメチルアミン (NDMA) の混入<sup>8)</sup>、Ranitidine への NDMA の混入<sup>9)</sup>、及びメトホルミン塩酸塩含有製剤への NDMA の混入<sup>10)</sup>などが認められており、製品回収、製法改良、包装改良、及び高感度分析法による出荷試験の設定など多大なコストと労力を費やす問題となっている。この様な背景もあり、ICH M7 ガイドラインでは変異原性不純物について、従来の ICH Q3 ガイドラインよりも厳格な管理基準を設定することが求められている (Table 3)<sup>11)</sup>。例えば原薬として一日摂取量 100 mg の生涯投与の医薬品の場合、構造決定の閾値を不純物の規格値として見ると、ICH Q3A において原薬中で 0.10%、ICH Q3B に

において製剤中で 0.2%であるが、仮に不純物が変異原性不純物に相当する場合は ICH M7 において原薬及び製剤とも管理限度値 0.0015%となり、非常に厳しい閾値で管理する必要がある。変異原性不純物の混入例の多くは予期せぬ副生成物と報告されているが、Ranitidine は分解生成物の可能性も示唆されており<sup>12)</sup>、医薬品開発においては開発初期から医薬品の本質的な分解機構の理解と安定性の把握が重要となってきた。

Table 3 Acceptable Intakes for an Individual Impurity

投与期間	1 ヶ月以下	1 ヶ月超 12 ヶ月まで	1 年超 10 年まで	10 年超 一生涯
1 日摂取量 (µg/day)	120	20	10	1.5

ここで、短期間での化学反応の反応速度定数と温度の相関関係としてはアレニウス式が知られており、医薬品の安定性試験においても多用されているが、湿度の影響が考慮されていないという問題を抱えていた。近年、式 (1) に表される湿度の影響を評価可能な湿度補正アレニウス式が提唱されている<sup>13),14)</sup>。

$$\ln k = \ln A - E_a/(R \cdot T) + B(\%RH) \quad (1)$$

ここで、 $k$  は反応速度定数、 $A$  は頻度因子、 $E_a$  は活性化エネルギー、 $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度、 $B$  は湿度に影響する因子、及び%RH は相対湿度を表す。本モデル式は経験式ではあるものの医薬品において良く当てはまる事が報告されており、温度及び相対湿度を様々に変えた短期安定性試験の結果に基づいて、任意の温度及び相対湿度の長期保存における安定性を評価可能である。本モデル式の多面的な安定性理解と短期安定性試験という特徴を利用して、承認申請にチャレンジする事例も増えている<sup>15),16)</sup>。また本モデル式をはじめとして様々な分解要因をアレニウス式に拡張し、医薬品の安定性予測の短期化と精度向上を目指した研究が行われている。

本研究では医薬品の迅速な安定性予測を目的とし、強制劣化試験による分解機構の把握とアレニウス式の利用による短期間での分解速度予測に着目し、それぞれの手法の妥当性及び拡張性について検討した。先ず強制劣化試験のモデル化合物としてタキサン化合物



DS80100717 を用いて、強制劣化試験における分解機構と原薬及び製剤における分解生成物を比較・検証した。次に製剤の安定性予測におけるアレニウス式の拡張として、添加剤であるステアリン酸マグネシウム (MgSt) との配合安定性が悪いアセチルサリチル酸をモデルとし、化学的安定性に及ぼす反応性添加剤の影響を短期間の安定性試験に基づいて評価した。また分解要因 (温度、相対湿度、及び添加剤含有量) と分解速度との相関を拡張型アレニウス式でモデル化し、実際の長期安定性試験への外挿を試みた。

# 第一章：新規タキサン化合物 DS80100717 の化学的安定性評価及び分解機構

## 1. 要旨

抗がん剤の作用機序を示す新規タキサン化合物 DS80100717 をモデルとし、原薬の強制劣化試験及び凍結乾燥製剤の加速試験を実施し、強制劣化条件における分解機構及び主要な分解生成物の同定を試みた。本化合物は溶液強制劣化試験において、酸性、塩基性、酸化条件下でいくつかの分解生成物が認められた。主分解生成物の化学構造は高速液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC/MS）及び核磁気共鳴法（NMR）により構造決定した。原薬固体分解物として加熱条件下において酸化分解物（*N*-oxide 体）及び酸性分解物（側鎖 C2'位のエピマー体）が認められ、凍結乾燥製剤においては、主分解生成物として酸性分解物（側鎖 C2'位のエピマー体）を認めた。本研究において、paclitaxel、docetaxel、及び cabazitaxel などのタキサン誘導体とは異なる DS80100717 の新規分解機構を見出した。

## 2. 緒言

Paclitaxel、docetaxel、及び cabazitaxel を含むタキサン誘導体は、微小管の内部表面に沿って結合する抗がん剤であり、その顕著な抗腫瘍活性効果が知られている<sup>17),18)</sup>。現在、これらの薬剤が肺癌、乳癌、卵巣癌、及びその他のがん治療において使用され、その効果が評価されている。多くのタキサン誘導体において薬物特性と治療効果の改善を目指して、プロドラッグ<sup>19)</sup>、アルブミン結合<sup>20)</sup>、リポソームカプセル化<sup>21)</sup>などの研究開発が進められている。

医薬品の研究開発においては、ICH ガイドラインに基づく品質管理及び安全性の観点から、医薬品の安定性の把握及び分解生成物の構造決定・閾値管理が厳格に求められている<sup>1),2),3),4)</sup>。強制劣化試験は、安定性評価を指向した分析法の開発、原薬及び製剤の本質的な安定性の理解、及び医薬品の分解機構の推定のために用いられる<sup>22)</sup>。強制劣化試験は、ICH ガイドライン Q1 シリーズに準拠し、液体及び固体の両方において様々な条件下で曝露する事で実施する<sup>23)</sup>。既報において、paclitaxel<sup>24)</sup>、docetaxel<sup>25)</sup>、及び cabazitaxel<sup>26)</sup>の強制劣化研究が報告されており、得られた情報は医薬品の開発および品質管理に用いられている。

タキサン誘導体化合物 DS80100717 ((1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,13*S*)-4-acetoxy-2-benzoyloxy-9,10-[(1*S*)-2-(dimethylamino)ethylidenedioxy]-5,20-epoxy-1-hydroxytax-11-en-13-yl (2*R*,3*S*)-3-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-hydroxy-3-(3-methyloxetan-3-yl)propionate)の化学構造<sup>27)</sup>及び上市済みのタキサン誘導体の化学構造を Figure 1 に示す。本研究は、種々のストレス条件下における原薬や製剤（凍結乾燥注射製剤）において、DS80100717 の化学的安定性及び分解機構を明らかにすることを目的とした。主分解生成物については、液体クロマトグラフィー-質量分析法（LC-MS）、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法（LC-MS/MS）、オンライン水素-重水素（H/D）交換 LC-MS、及び NMR スペクトルデータにより構造を同定した。

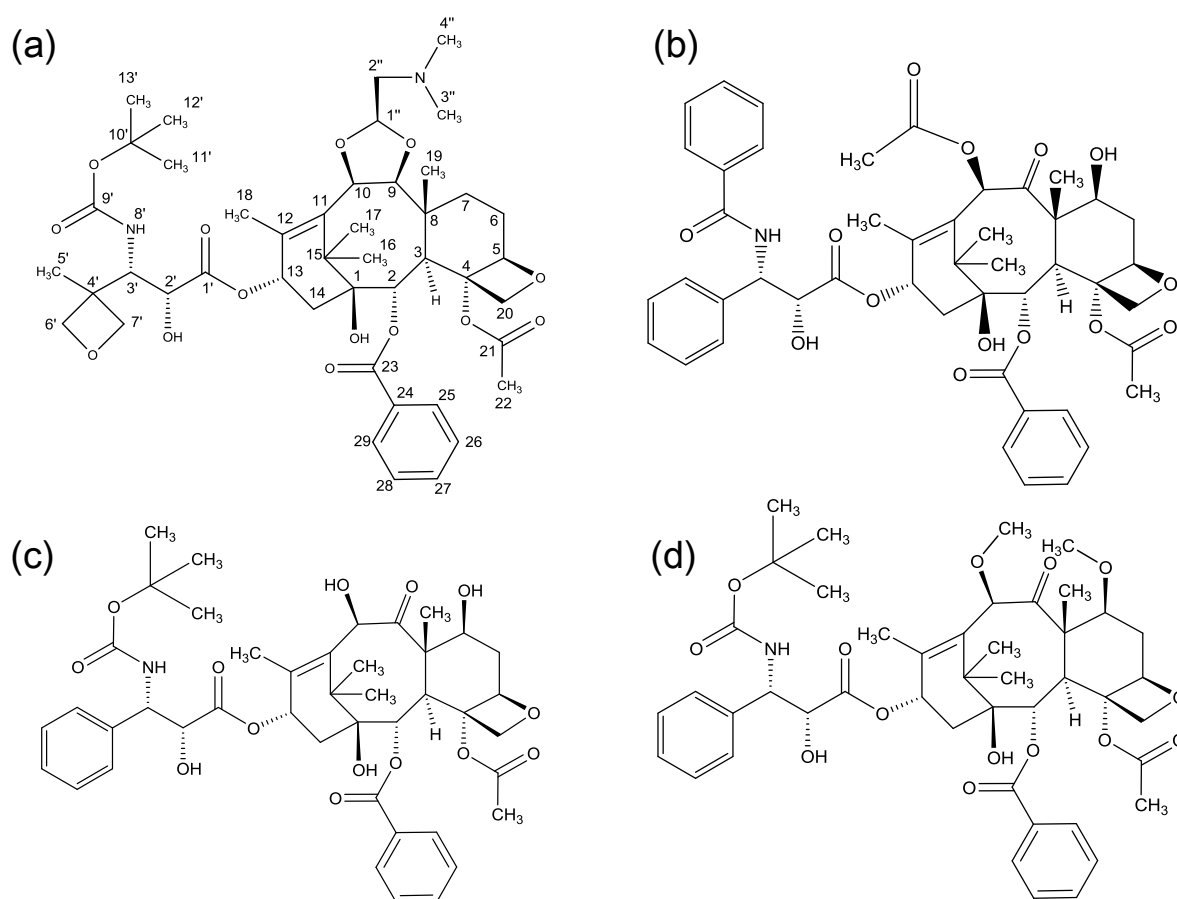


Figure 1 Chemical Structures of DS80100717 and Taxane-derivatives.

(a) DS80100717, (b) Paclitaxel, (c) Docetaxel, (d) Cabazitaxel

### 3. 実験

#### 1) 試薬

DS80100717 原薬は第一三共株式会社より入手した。塩酸 (HCl) と水酸化ナトリウム (NaOH) は容量分析グレード、乳糖一水和物は特級、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) は特級を使用し、いずれも富士フィルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。乳酸は Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) の特級を使用した。Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2.0 ~12.0、イオン強度:1.0) は、ナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) の特級を使用した。ギ酸アンモニウムは特級、メタノールは HPLC グレードを富士フィルム和光純薬工業株式会社から購入した。アセトニトリルは HPLC グレードを関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。アセトニトリル-*d*<sub>3</sub>、メタノール-*d*<sub>4</sub>、及び重水は Cambridge Isotope Labs (Andover, MA, USA) より購入した。精製水は富士フィルム和光純薬工業株式会社の LC/MS 用グレードを使用した。その他の試薬はいずれも分析グレードの市販品を使用した。

#### 2) DS80100717 凍結乾燥製剤の調製

DS80100717 凍結乾燥製剤の成分および組成を Table 4 に示す。試料は以下のように調製した。DS80100717 原薬及び添加物 (乳糖一水和物、乳酸) を精製水に溶解した。1 mol/L 塩酸溶液又は 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 4.0 に調整した。溶液の容量を精製水で 1 mL に調製した後、0.20 µm メンブレンフィルター (Millex-LG Hydrophilic polytetrafluoroethylene, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) でろ過した。バルク液をバイアルに充填した後、充填したバイアルをゴム栓で半止めした。サンプルは凍結乾燥機 (VirTis AdVantage Plus, SP Scientific, Stone Ridge, NY, USA) を用いて凍結乾燥した。凍結乾燥プログラムは以下の通りであった (凍結乾燥工程の間、チャンバー圧は制御されなかった) : 凍結: -40 °C、2 時間、一次乾燥: -20 °C、12 時間、二次乾燥: -5 °C、5 時間、三次乾燥: 5 °C、3 時間。凍結乾燥後、試料は窒素雰囲気下で減圧した。最後に、キャップ付きバイアルにゴム栓を完全に挿入した。

Table 4 Components and Composition of DS80100717 Drug Product

Functions	Component	Recipe
Active pharmaceutical ingredients	DS80100717	10 mg
Bulking agent	Lactose monohydrate	50 mg
pH adjusting agent	Lactic acid	2.1 mg
	Hydrochloric acid	q.s. <sup>a</sup>
Solvent	Sodium hydroxide	q.s. <sup>a</sup>
pH		4.0
Total volume	Purified water	1.0 mL, q.s. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> quantum sufficit

### 3) DS80100717 原薬の溶液強制劣化試験

DS80100717 原薬は試料濃度 1 mg/mL で種々の溶液強制劣化条件下において保存した。酸性加水分解では 0.1 mol/L HCl 溶液に試料溶液を混合した後、40 °C で 1 時間保存し、塩基性加水分解では Britton–Robinson 緩衝液 (pH 10.0、イオン強度 0.2) に試料溶液を混合し、40 °C で 1 時間保存した。酸化条件下での強制劣化試験は、試料溶液を 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液と混合し、25 °C で 1 時間保存した。

### 4) DS80100717 原薬の固体での強制劣化試験

DS80100717 原薬を固体状態で種々の強制劣化条件に曝した。加熱条件下での強制劣化試験として、秤量皿 (open) に DS80100717 原薬 (100mg) を入れ、60 °C 恒温庫で 4 週間保存した。湿度条件下での強制劣化試験として、秤量皿 (open) に DS80100717 原薬 (100mg) を入れ、75%相対湿度 (RH) 下、40 °C で 4 週間保存した。光照射条件下での強制劣化試験として、秤量皿 (open) に DS80100717 原薬 (100mg) を入れ、ICH 条件 (ICH Q1B option 1、D65 光源、2000 lx) に従って室温で 4 週間 (1344000 lx·h) 保存した。

### 5) DS80100717 凍結乾燥製剤の加速及び苛酷試験

DS80100717 製剤を 25 °C 及び 40 °C で 4 週間、60 °C で 2 週間保存した。

## 6) HPLC 分析のための試料調製

DS80100717 原薬、製剤、及びその劣化検体は、それぞれ試料溶解液アセトニトリル/水 (3:2 (v/v)) を用いて試料濃度 0.5 mg/mL に調製した後、HPLC 分析に用いた。

## 4. 測定

### 1) HPLC 分析

HPLC 分析には、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を搭載した島津 Nexera X2 LC システム (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を用いた。分析カラムとして YMC Triart C18 (2.0 mm i.d. × 75 mm, 粒子径 1.9 μm、YMC, Kyoto, Japan) を用いた。カラムオープンの温度は 40 °C とした。UV 検出波長は 229 nm に設定した。オンライン PDA スペクトルは 200~400 nm の間で採取した。移動相 A は 20 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液、移動相 B はアセトニトリル/メタノール (57:43 (v/v)) を使用した。流速は 0.5 mL/min とした。溶媒グラジエント溶出は、移動相 B の割合を時間で変化させて次のステップ勾配とした。T (min)/%移動相 B = 0/35, 2.3/50, 4.1/66, 5.1/90, 10/90, 10.1/35, 14/35。注入量は 2 μL とした。データ取得には Empower 3 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を用いた。

### 2) 分取 HPLC 条件

主分解生成物 (Ac-5 及び Ox-1) の単離は、島津 Nexera X2 LC システム (Shimadzu Corporation) 及び Explorer-220 溶媒蒸発器 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。分取には Cadenza CD-C18 (6.0 mm i.d. × 100 mm, 粒子径 3 μm、Imtakt Corporation, Kyoto, Japan) を用いた。移動相、カラムオープン温度、及び UV 検出は、前述の分析用 HPLC 条件と同じであった。移動相 A/B (2:3 (v/v)) の比率でアイソクラチック溶出を行い、流速は 2 mL/min とした。注入量は 50 μL、分析時間は 12 分とした。分解生成物の溶出画分を分取し、溶媒エバポレーターを用いて溶媒を除去し、固体として Ac-5 (HPLC 純度: 94.2 area%) 及び Ox-1 (HPLC 純度: 94.0 area%) を得た。

### 3) LC-MS 測定及び MS/MS 測定

LC-MS 測定及び LC-MS/MS 測定は、LTQ Orbitrap XL 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) と接続した Shimadzu Nexera X2 LC システムを用いて行った。HPLC 条件は前述の分析 HPLC 条件と同じであった。オンライン H/D 交換 LC-MS 測定には、移動相 A 及

び B の溶媒を重水とメタノール- $d_4$ に置換したものをを用いた。MS 測定は正イオンモードでエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用い、スプレー電圧は 4.0 kV に設定した。キャピラリー温度は 275 °C とした。Sheath ガス流量は 60 arb、Aux ガス流量は 10 arb とした。MS/MS 測定は衝突エネルギー35%でデータ取得を行った。

#### 4) NMR 測定

NMR 測定は、BBO 5 mm プローブを備えた Avance 400 MHz NMR 分光計(Bruker BioSpin Corporation, Billerica, MA, USA)を用いて行った。単離試料 (Ac-5 及び Ox-1) はアセトニトリル- $d_3$ /重水 (9:1 (v/v)) に溶解し、NMR スペクトルを取得した。NMR 測定は 25 °C で行った。化学シフトはアセトニトリル- $d_3$  の残留溶媒ピーク ( $^1\text{H}$  で  $\delta$  1.94 ppm、 $^{13}\text{C}$  で  $\delta$  1.32 ppm) で補正した。積算回数は 32~4096 回であった。単離試料の構造決定のための NMR 測定として、1D 測定 ( $^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMR) 及び 2D 測定 ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correlation spectroscopy, distortionless enhancement by polarization transfer,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear multiple bond quantum correlation spectroscopy, and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)) を実施した。

## 5. 結果及び考察

### 1) DS80100717 原薬及び凍結乾燥製剤の安定性試験

DS80100717 原薬は溶液中で酸性、塩基性、及び酸化性条件下で分解した。DS80100717 原薬の溶液安定性試験の代表的な HPLC クロマトグラムを Figure 2 に示す。8 種類の主分解生成物 (Ac-1, -2, -3, -4, -5, Ba-1, -2, Ox-1) が認められた。これらの潜在的な分解生成物の定義は既報<sup>28)</sup>に従い、主薬分解量が 10%以下であり、なおかつ最大の分解生成物に対して個々の分解生成物がその 25%以上であるものを定義づけした。これらの分解生成物を選ぶ妥当性として、ICH Q3A 及び Q3B ガイドラインで定義されている長期安定性試験において認められる分解生成物は、強制劣化試験において認められる分解生成物の一部であると報告されている<sup>29)</sup>。これらの主分解生成物の化学構造と分解機構を Figure 3 に示す。

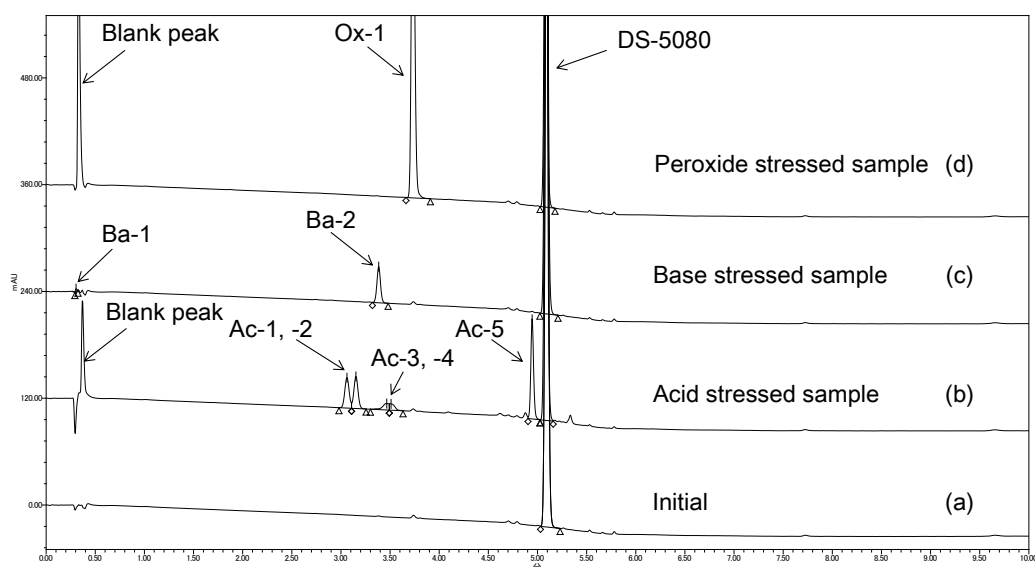


Figure 2 Representative HPLC Chromatograms of the Solution Stability Studies of DS80100717 Drug Substance. a) Initial, (b) 0.1 mol/L HCl at 40 °C for 1 h, (c) Britton–Robinson Buffer (Ionic Strength: 0.2, pH 10.0) at 40 °C for 1 h, (d) 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 25 °C for 1 h.



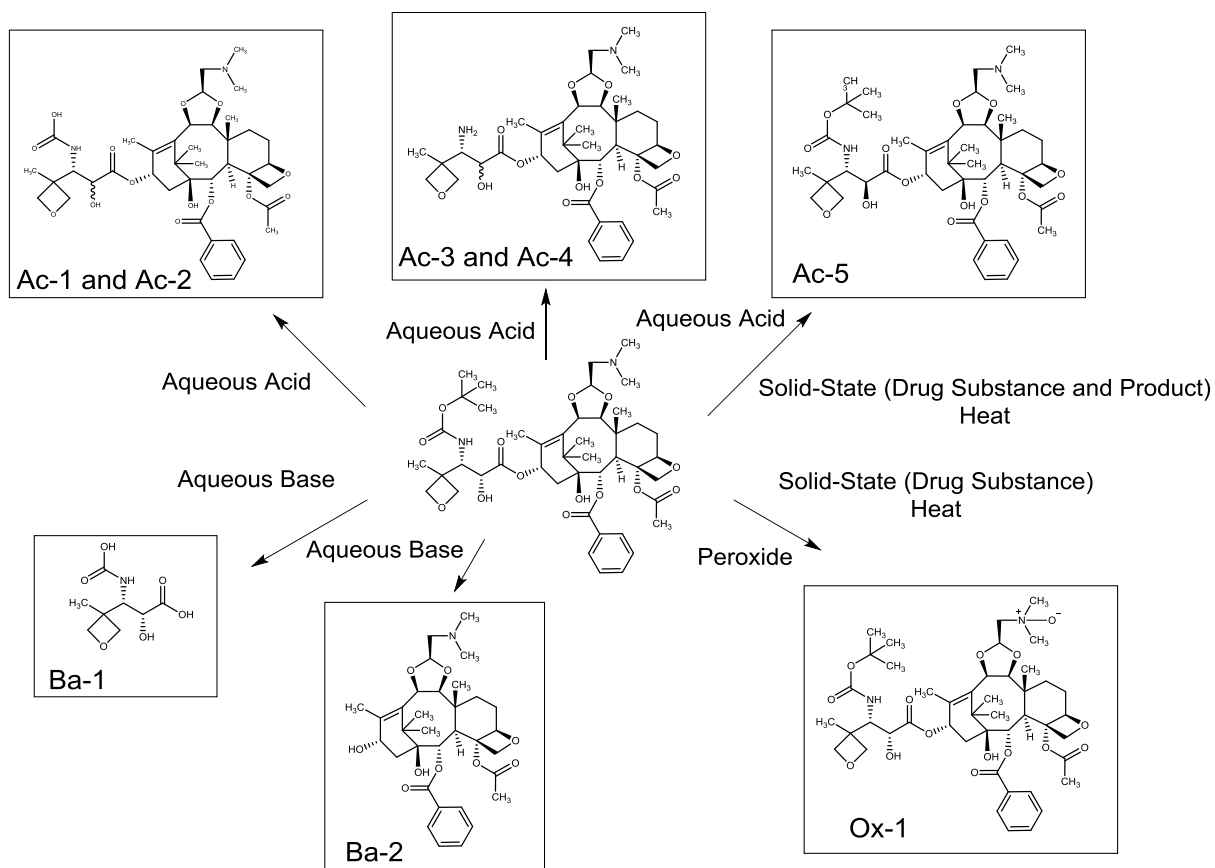


Figure 3 Chemical Structure of DS80100717 and Degradation Products

固体状態での加熱条件下での保存において、DS80100717 原薬は酸化を経て Ox-1 が増加した(0.32% → 0.48%)。同時に酸加水分解を経て Ac-5 が増加した (0.03% → 0.09%)。また DS80100717 原薬は湿度及び光照射下 (D65 光源、2000 lx) で安定であった。

DS80100717 原薬の各種条件下での固体安定性の結果を Table 5 に示す。

DS80100717 製剤の加熱条件下での安定性の代表的な HPLC クロマトグラムを Figure 4 に示す。加熱条件下において、DS80100717 は酸加水分解を介して分解し、40 °C で 4 週間保存後に Ac-5 (0.10% → 2.39%) が認められた。一方、酸化分解物 (Ox-1) は製剤バイアルが窒素雰囲気下のため、加熱条件下では増加しなかった。DS80100717 製剤の加熱条件下での安定性試験結果を Table 6 に示す。

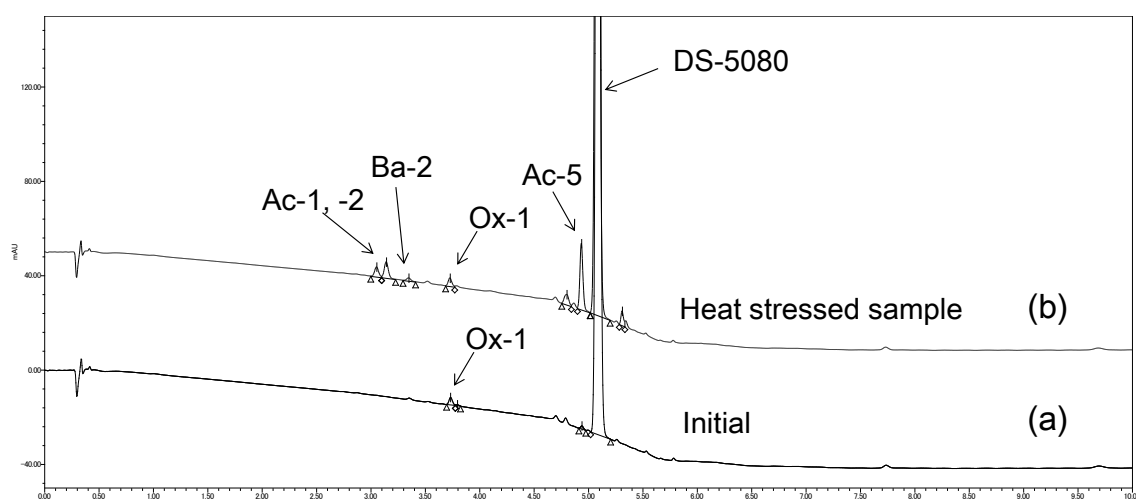


Figure 4 Representative HPLC Chromatograms of DS80100717 Drug Products  
(a) Initial, (b) 40 °C for 4 Weeks.

Table 5 Results of Stress Studies of DS80100717 Drug Substance in Solid-state

RRT	Compound I.D.	-	60°C	40°C/ 75%RH	25°C, D65 light, (1,344,000 lx·hr) <sup>a</sup>	25°C, Dark control	
		Initial	4 weeks	4 weeks	4 weeks	4 weeks	
0.34	Ba-2	n.d. <sup>b</sup>	0.06	n.d.	n.d.	n.d.	
0.52		n.d.	<0.03 <sup>c</sup>	<0.03	<0.03	<0.03	
0.57		n.d.	n.d.	<0.03	<0.03	<0.03	
0.65		0.07	0.05	0.07	0.05	0.06	
0.73		0.04	0.03	n.d.	0.08	0.04	
0.74		n.d.	0.04	0.04	n.d.	n.d.	
0.76		Ox-1	0.32	0.48	0.35	0.32	0.34
0.78			<0.03	<0.03	<0.03	n.d.	<0.03
0.81			n.d.	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
0.83			n.d.	<0.03	n.d.	n.d.	n.d.
0.85	n.d.	<0.03	n.d.	<0.03	n.d.		
0.86	n.d.	0.03	<0.03	<0.03	<0.03		
0.88	n.d.	0.10	<0.03	n.d.	<0.03		
0.89	n.d.	n.d.	<0.03	0.04	<0.03		
0.90	Ac-5	0.17	0.21	0.18	0.18	0.18	
0.92		0.21	0.21	0.21	0.19	0.23	
0.95		0.03	0.08	n.d.	<0.03	n.d.	
0.97		0.03	0.09	0.03	0.03	0.03	
0.98		<0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1.02		n.d.	0.01	n.d.	n.d.	n.d.	
1.03		0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	
1.09		0.13	0.12	0.13	0.14	0.13	
1.12		0.08	0.08	0.07	0.08	0.08	
1.14		0.21	0.20	0.19	0.20	0.19	
Total related substance		1.38	1.89	1.39	1.44	1.40	

<sup>a</sup> ICH Q1B Option 1 (2000 lx)

<sup>b</sup> not detected

<sup>c</sup> less than 0.03

Table 6 Results of Stress Studies of DS80100717 Drug Products after Storage at 25 °C, 40 °C and 60 °C

Relative Retention Time	Compound I.D.	-	25°C		40°C		60°C	
		Initial	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks	1 week	2 weeks
0.52		n.d. <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03 <sup>b</sup>	0.03
0.54		n.d.	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	n.d.	<0.03
0.57		<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
0.58		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03	0.03	0.05
0.60	Ac-1	n.d.	0.08	0.15	0.29	0.47	0.83	1.13
0.62	Ac-2	n.d.	0.12	0.23	0.45	0.78	1.40	2.02
0.66	Ba-2	0.07	0.08	0.08	0.10	0.15	0.29	0.55
0.67		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03
0.69	Ac-3 and Ac-4	0.03	0.04	0.05	0.07	0.10	0.19	0.26
0.70		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03
0.72		n.d.	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	n.d.	n.d.
0.73	Ox-1	0.32	0.34	0.34	0.35	0.35	0.35	0.36
0.75		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.06
0.76		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03
0.80		<0.03	<0.03	<0.03	0.03	0.08	0.12	0.16
0.82		<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	n.d.	n.d.	n.d.
0.87		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03	<0.03
0.88		<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
0.90		n.d.	<0.03	<0.03	n.d.	<0.03	0.03	0.13
0.91		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03	n.d.	n.d.
0.92		0.22	0.19	0.22	0.17	0.15	0.14	0.20
0.94		0.20	0.23	0.28	0.38	0.55	0.87	1.27
0.96		n.d.	0.02	0.03	0.07	0.15	0.32	0.56
0.97	Ac-5	0.10	0.43	0.70	1.38	2.39	4.31	6.51
0.98		0.03	0.03	<0.03	<0.03	n.d.	n.d.	n.d.
1.02		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05	0.08
1.03		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03	0.03
1.03		0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06
1.04		n.d.	0.06	0.13	0.25	0.44	0.73	1.04
1.05		n.d.	0.03	0.05	0.11	0.18	0.33	0.49
1.07		n.d.	n.d.	n.d.	<0.03	<0.03	n.d.	<0.03
1.09		0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
1.11		<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
1.14		0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06
1.19		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.03	0.03
Total Related Substance (%)		1.29	2.04	2.62	4.01	6.13	10.33	15.28

<sup>a</sup> not detected

<sup>b</sup> less than 0.03%

## 2) 主分解生成物の構造解析

### i) 酸性条件における主分解生成物

主分解生成物の LC-MS 分析データを Table 7 に示す。Ac-1 及び-2 の両方において  $m/z$  801 のプロトン付加分子 ( $[M+H]^+$ ) が検出され、これは DS80100717 の  $[M+H]^+$   $m/z$  857 より 56 Da 少なかった。Ac-1 及び-2 の精密 MS スペクトルは、それぞれ  $[M+H]^+$   $m/z$  801.3800 と  $m/z$  801.3804 ( $C_{41}H_{57}O_{14}N_2$  における理論値  $m/z$  801.3810) を示した。特徴的なプロダクトイオンとして  $m/z$  582、313、及び 295 が観察された。これらのプロダクトイオンは、Ac-1 及び-2 がタキサン本体構造を保持していることを示した。Ac-1 及び-2 のオンライン H/D 交換 LC-MS 分析では、4 つの交換性プロトン数の存在を示し、これは DS80100717 よりも 1 プロトン多かった。これらの結果に基づいて、Ac-1 及び-2 の化学構造は、DS80100717 の側鎖 *tert*-butoxy 部位が加水分解された C2' エピマー体 (2*R*,3*S* 及び 2*S*,3*S*) であると同定した。

Ac-3 及び-4 の両方において  $m/z$  757 のプロトン付加分子が検出され、これは DS80100717 の  $[M+H]^+$   $m/z$  857 より 100 Da 少なかった。Ac-3 及び-4 の精密 MS スペクトルは、それぞれ  $[M+H]^+$   $m/z$  757.3903 と  $m/z$  757.3898 ( $C_{40}H_{57}O_{12}N_2$  における理論値  $m/z$  757.3912) を示した。特徴的なプロダクトイオンとして  $m/z$  582、313、及び 295 が観察された。これらのプロダクトイオンは、Ac-3 及び-4 がタキサン本体構造を保持していることを示した。Ac-3 及び-4 のオンライン H/D 交換 LC-MS 分析では、4 つの交換性プロトン数の存在を示し、これは DS80100717 よりも 1 プロトン多かった。これらの結果に基づいて、Ac-3 及び-4 の化学構造は、DS80100717 の側鎖 *tert*-butoxycarbonyl 部位が加水分解された C2' エピマー体 (2*R*,3*S* 及び 2*S*,3*S*) であると同定した。

Ac-5 では  $m/z$  857 のプロトン付加分子が検出され、DS80100717 の  $[M+H]^+$   $m/z$  857 と同じ質量であった。Ac-5 の精密 MS スペクトルは、 $[M+H]^+$   $m/z$  857.4422 ( $C_{45}H_{65}O_{14}N_2$  における理論値  $m/z$  857.4436) を示した。特徴的なプロダクトイオンとして  $m/z$  839、801、及び 783 が認められ、これらは DS80100717 においても認められた。Ac-5 と DS80100717 のオンライン H/D 交換 LC-MS 解析では、それぞれの化合物の交換性プロトン数に差はなかった。単離した Ac-5 の  $^1H$ -NMR スペクトルを Figure 5 に示す。Ac-5 の H2'、H3'、及び H5' のシグナルは DS80100717 に比べて低磁場側に有意に変動した。加えて、H22、H6'、及び H7' のシグナルは高磁場側に有意に変動した。C22、C2'、C3'、C4'、C5'、C6'、及び C7' での  $^{13}C$ -NMR スペクトルのシグナルにおいても同様の傾向が観察された。これら化学

シフトの変動は、Ac-5 の側鎖 C2'位において立体構造の変化が起きた事を示唆した。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY 実験においては、H22 のシグナルとの相関として H2'、H3'、H6'、及び H7' のシグナルを検出し、これは既報のパクリタキセル分子での NOESY 実験<sup>30)</sup>において立体的に近接する位置と報告されていた。<sup>1</sup>H-NMR の重要な結果として、Ac-5 の  $\delta_{\text{H}2'}$  4.76ppm のビシナルカップリング定数が  $J_{(2',3')}=6.0$  Hz に対し、DS80100717 の  $\delta_{\text{H}2'}$  4.51ppm は  $J_{(2',3')}=2.0$  Hz と明らかに異なっていた (Table 8 及び 9)。これは Ac-5 の H2' と H3' の間の立体配座が、Karplus 式<sup>31)</sup>に従って *anti* 配座に反転 (DS80100717 は *gauche* 配座) している事を示唆した。以上より、Ac-5 は側鎖 C2'エピマー体 (2*S*,3*S*) と同定した。

Table 7 Results of LC-MS Analysis

Target	Relative retention time (RRT) by LC-MS analysis	Mass data ( <i>m/z</i> )	Proposed molecular formula ([M+H] <sup>+</sup> )	Error (mDa)	Productions by MS/MS analysis ( <i>m/z</i> )	Number of labile hydrogen atoms
DS80100717	1.00	857.4425	C <sub>45</sub> H <sub>65</sub> O <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	-1.08	839, 801, 783, 661, 313, 295	3
Ac-1	0.62	801.3800	C <sub>41</sub> H <sub>57</sub> O <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	-0.95	783, 582, 564, 522, 400, 313, 295, 277	4
Ac-2	0.64	801.3804	C <sub>41</sub> H <sub>57</sub> O <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	-0.63	783, 741, 582, 522, 400, 313, 295, 277	4
Ac-3	0.70	757.3903	C <sub>40</sub> H <sub>57</sub> O <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	-0.87	739, 670, 582, 313, 295	4
Ac-4	0.71	757.3898	C <sub>40</sub> H <sub>57</sub> O <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	-1.35	739, 670, 582, 313, 295	4
Ac-5	0.97	857.4422	C <sub>45</sub> H <sub>65</sub> O <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	-1.34	839, 801, 783	3
Ba-1	0.07	220.0819	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> N	-0.24	202, 176, 174, 158, 156, 130, 100	6
Ba-2	0.67	600.3162	C <sub>33</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub> N	-1.03	582, 564, 540, 522, 460, 331, 313, 295	2
Ox-1	0.77	873.4361	C <sub>45</sub> H <sub>65</sub> O <sub>15</sub> N <sub>2</sub>	-2.37	817, 773	3

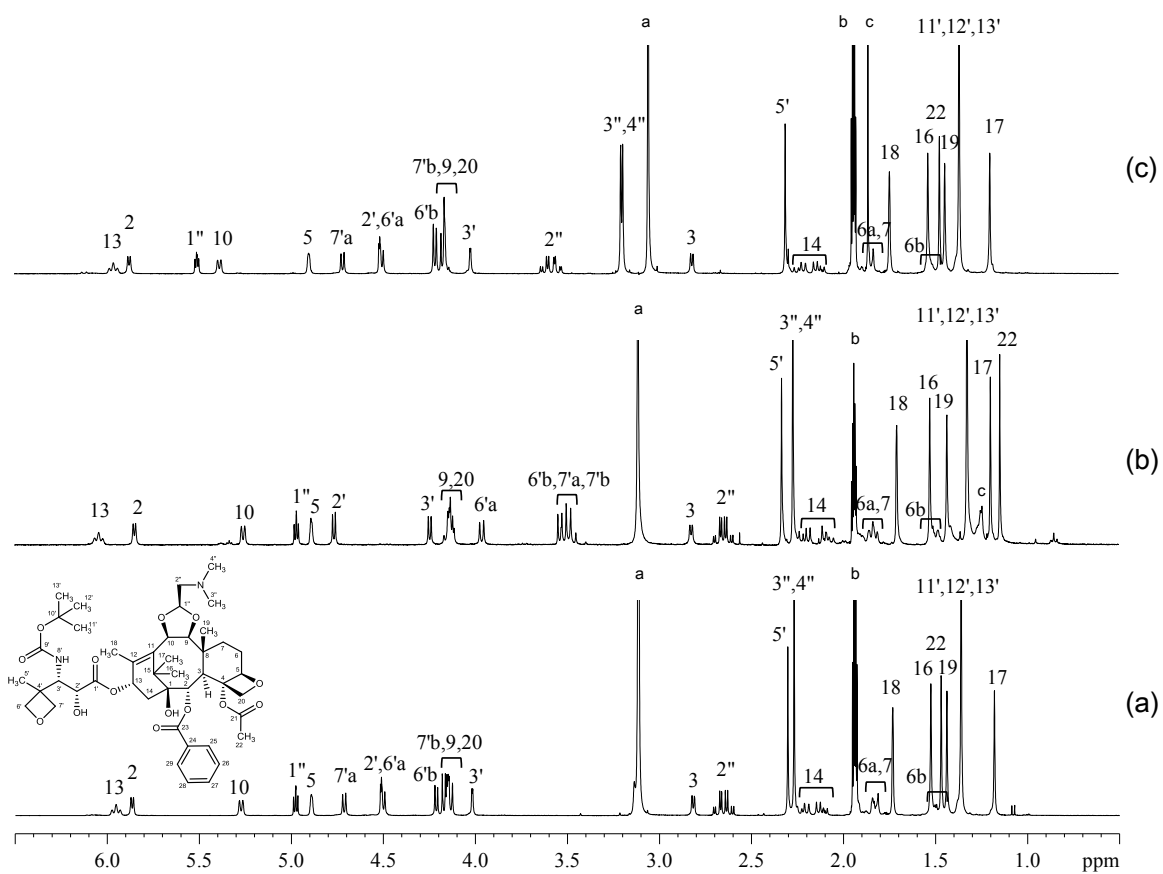


Figure 5 Overlay of <sup>1</sup>H-NMR Spectra of (a) DS80100717, (b) Ac-5, (c) Ox-1

<sup>a</sup> Residual solvent (water), <sup>b</sup> Residual solvent (acetonitrile), <sup>c</sup> Contaminants.



Table 8 NMR Signal Assignments of DS80100717

Site	DS80100717			
	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR		
	Chemical shift (ppm) <sup>a</sup>	Chemical shift (ppm) <sup>b</sup>	Multiplicity and coupling, <i>J</i> (Hz) <sup>c</sup>	Relative integral
1	78.68	-	-	-
1-OH	-	-	-	1
2	77.82	5.87	d, <i>J</i> <sub>(2,3)</sub> = 5.2	1
3	40.53	2.82	d, <i>J</i> <sub>(3,2)</sub> = 5.2	1
4	83.43	-	-	-
5	88.18	4.89	br	1
6	24.57	1.92 to 1.81	m	1
		1.57 to 1.44	m	1
7	33.33	1.96 to 1.81	m	2
8	42.86	-	-	-
9	78.62	4.16 to 4.13	m	1
10	81.51	5.27	d, <i>J</i> <sub>(10,9)</sub> = 7.2	1
11	133.57	-	-	-
12	136.09	-	-	-
13	72.82	5.95	t, <i>J</i> <sub>(13,14)</sub> = 8.8	1
14	36.57	2.25 to 2.19	m	1
		2.15 to 2.09	m	1
15	44.71	-	-	-
16	23.64	1.53	s	3
17	28.09	1.18	s	3
18	14.84	1.73	s	3
19	25.53	1.44	s	3
20	77.71	4.16 to 4.13	m	2
21	172.15	-	-	-
22	23.03	1.47	s	3
23	167.09	-	-	-
24	131.15	-	-	-
25 and 29	131.08	8.12 to 8.10	m	2
26 and 28	129.62	7.55 to 7.51	m	2
27	134.42	7.66 to 7.62	m	1
1'	173.89	-	-	-
2'	71.52	4.51	d, <i>J</i> <sub>(2',3)</sub> = 2.1	1
2'-OH	-	-	-	1
3'	56.63	4.02	d, <i>J</i> <sub>(3',2')</sub> = 1.8	1
4'	43.30	-	-	-
5'	23.74	2.30	s	3
6'	80.81	4.50	d, <i>J</i> <sub>(6'a,6'b)</sub> = 7.3	1
		4.21	d, <i>J</i> <sub>(6'b,6'a)</sub> = 5.9	1
7'	79.85	4.71	d, <i>J</i> <sub>(7'a,7'b)</sub> = 6.6	1
		4.17	d, <i>J</i> <sub>(7'b,7'a)</sub> = 6.6	1
8' (NH)	-	-	-	1
9'	157.25	-	-	-
10'	80.34	-	-	-
11', 12', and 13'	28.57	1.36	s	9
1''	103.10	4.98	t, <i>J</i> <sub>(1'',2'')</sub> = 4.6	1
2''	61.91	2.71 to 2.60	m	2
3''	46.33	2.27	s	6
4''				

<sup>a</sup> The chemical shifts are referenced against the signal of acetonitrile,  $\delta$ : 1.32 ppm.

<sup>b</sup> The chemical shifts are referenced against the signal of acetonitrile,  $\delta$ : 1.94 ppm.

<sup>c</sup> s: singlet, d: doublet, t: triplet, br: broad, m: multiplet

Table 9 NMR Signal Assignments of Ac-5

Site	Ac-5			
	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR		
	Chemical shift (ppm) <sup>a</sup>	Chemical shift (ppm) <sup>b</sup>	Multiplicity and coupling, <i>J</i> (Hz) <sup>c</sup>	Relative integral
1	78.88	-	-	-
1-OH	-	-	-	1
2	77.90	5.85	d, <i>J</i> <sub>(2,3)</sub> = 5.3	1
3	40.50	2.82	d, <i>J</i> <sub>(3,2)</sub> = 5.3	1
4	82.91	-	-	-
5	88.26	4.89	br	1
6	24.50	1.91 to 1.81	m	1
		1.53 to 1.42	m	1
7	33.47	1.96 to 1.81	m	2
8	42.67	-	-	-
9	78.62	4.17 to 4.11	m	1
10	81.47	5.26	d, <i>J</i> <sub>(10,9)</sub> = 7.2	1
11	133.46	-	-	-
12	136.32	-	-	-
13	72.12	6.04	t, <i>J</i> <sub>(13,14)</sub> = 8.9	1
14	36.40	2.24 to 2.18	m	1
		2.13 to 2.05	m	1
15	44.67	-	-	-
16	23.75	1.53	s	3
17	28.02	1.20	s	3
18	14.67	1.71	s	3
19	25.52	1.43	s	3
20	77.61	4.17 to 4.11	m	2
21	171.72	-	-	-
22	22.13	1.15	s	3
23	164.91	-	-	-
24	131.04	-	-	-
25 and 29	131.04	8.10 to 8.08	m	2
26 and 28	129.62	7.54 to 7.50	m	2
27	134.39	7.65 to 7.61	m	1
1'	171.54	-	-	-
2'	80.96	4.76	d, <i>J</i> <sub>(2',3')</sub> = 6.0	1
2'-OH	-	-	-	1
3'	61.91	4.24	d, <i>J</i> <sub>(3',2')</sub> = 6.1	1
4'	48.07	-	-	-
5'	23.53	2.33	s	3
6'	76.66	3.96	d, <i>J</i> <sub>(6'a,6'b)</sub> = 8.8	1
		3.54	d, <i>J</i> <sub>(6'b,6'a)</sub> = 8.7	1
7'	64.76	3.53 to 3.43	m	2
8' (NH)	-	-	-	1
9'	156.33	-	-	-
10'	80.49	-	-	-
11', 12', and 13'	28.63	1.33	s	9
1''	102.98	4.97	t, <i>J</i> <sub>(1'',2'')</sub> = 4.6	1
2''	61.91	2.70 to 2.60	m	2
3''	46.32	2.27	s	6
4''				

<sup>a</sup> The chemical shifts are referenced against the signal of acetonitrile,  $\delta$ : 1.32 ppm.

<sup>b</sup> The chemical shifts are referenced against the signal of acetonitrile,  $\delta$ : 1.94 ppm.

<sup>c</sup> s: singlet, d: doublet, t: triplet, br: broad, m: multiplet

## ii) 塩基性条件及び酸性条件における主分解生成物

Ba-1 においては  $m/z$  220 のプロトン付加分子が検出され、これは DS80100717 の  $[M+H]^+$   $m/z$  857 より 637 Da 少なかった。Ba-1 の精密 MS スペクトルは、 $[M+H]^+$   $m/z$  220.0819 ( $C_8H_{14}O_6N$  における理論値  $m/z$  220.0821) を示した。特徴的なプロダクトイオンとして  $m/z$  176、174、130、及び 100 が観察された。Ba-1 のプロダクトイオンは DS80100717 の C13 位の側鎖と一致した。以上の結果に基づき、Ba-1 は DS80100717 の C13 位で加水分解された側鎖であると同定した。

Ba-2 では  $m/z$  600 のプロトン付加分子が検出され、DS80100717 の  $[M+H]^+$   $m/z$  857 より 257 Da 少なかった。Ba-2 の精密 MS スペクトルは、 $[M+H]^+$   $m/z$  600.3162 ( $C_{33}H_{46}O_9N$  における理論値  $m/z$  600.3173) を示した。特徴的なプロダクトイオンとして  $m/z$  313 及び 295 が観察された。これらのプロダクトイオンは、Ba-2 がタキサン本体構造を保持していることを示した。Ba-2 のオンライン H/D 交換 LC-MS 分析では、2 つの交換性プロトン数の存在を示し、これは DS80100717 よりも 1 プロトン少なかった。これらの結果に基づいて、Ba-2 の化学構造は、DS80100717 の C13 位で加水分解されたタキサン本体構造であると同定した。

Ox-1 では  $m/z$  873 のプロトン付加分子が検出され、DS80100717 の  $[M+H]^+$   $m/z$  857 より 16 Da 多かった。Ox-1 の精密 MS スペクトルは、 $[M+H]^+$   $m/z$  873.4361 ( $C_{45}H_{65}O_{15}N_2$  における理論値  $m/z$  873.4385) を示した。特徴的なプロダクトイオンとして  $m/z$  817 が観察され、DS80100717 に酸素分子が付加している事を示唆した。Ox-1 のオンライン H/D 交換 LC-MS 分析では、DS80100717 の交換性プロトン数と同一であった。単離した Ox-1 の  $^1H$ -NMR スペクトルを Figure 5 に示す。DS80100717 の  $^1H$ -NMR スペクトルと比較して、Ox-1 の H1'', H2'', H3'', 及び H4'' のシグナルは有意に低磁場側に変動した。 $^{13}C$ -NMR スペクトルにおいても同様に C1'', C2'', C3'', 及び C4'' のシグナルの変動が観察され、これはタキサン本体構造の三級アミンの構造変化を示唆した (Table 10)。以上の結果に基づき、Ox-1 は DS80100717 の *N*-oxide 体として同定した。

Table 10 NMR Signal Assignments of Ox-1

Site	Ox-1			
	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR		
	Chemical shift (ppm) <sup>a</sup>	Chemical shift (ppm) <sup>b</sup>	Multiplicity and coupling, <i>J</i> (Hz) <sup>c</sup>	Relative integral
1	78.64	-	-	-
1-OH	-	-	-	1
2	77.75	5.88	d, <i>J</i> <sub>(2,3)</sub> = 5.2	1
3	40.54	2.82	d, <i>J</i> <sub>(3,2)</sub> = 5.2	1
4	83.35	-	-	-
5	88.13	4.90	br	1
6	24.56	1.91 to 1.80	m	1
		1.54 to 1.40	m	1
7	33.26	1.96 to 1.80	m	2
8	42.84	-	-	-
9	78.81	4.22 to 4.18	m	1
10	81.79	5.39	d, <i>J</i> <sub>(10,9)</sub> = 7.2	1
11	133.05	-	-	-
12	136.57	-	-	-
13	72.77	5.96	t, <i>J</i> <sub>(13,14)</sub> = 8.8	1
14	36.54	2.26 to 2.20	m	1
		2.16 to 2.10	m	1
15	44.79	-	-	-
16	23.65	1.51	s	3
17	28.06	1.20	s	3
18	14.88	1.75	s	3
19	25.40	1.44	s	3
20	77.69	4.22 to 4.13	m	2
21	172.12	-	-	-
22	23.05	1.47	s	3
23	167.12	-	-	-
24	131.10	-	-	-
25 and 29	131.10	8.12 to 8.10	m	2
26 and 28	129.64	7.55 to 7.51	m	2
27	134.46	7.66 to 7.62	m	1
1'	173.95	-	-	-
2'	71.52	4.52	d, <i>J</i> <sub>(2',3')</sub> = 2.0	1
2'-OH	-	-	-	1
3'	56.64	4.02	d, <i>J</i> <sub>(3',2')</sub> = 1.8	1
4'	43.31	-	-	-
5'	23.77	2.31	s	3
6'	80.80	4.50	d, <i>J</i> <sub>(6'a,6'b)</sub> = 7.6	1
		4.22	d, <i>J</i> <sub>(6'b,6'a)</sub> = 6.5	1
7'	79.85	4.72	d, <i>J</i> <sub>(7'd,7'b)</sub> = 6.7	1
		4.17	d, <i>J</i> <sub>(7'b,7'a)</sub> = 6.8	1
8' (NH)	-	-	-	1
9'	157.27	-	-	-
10'	80.34	-	-	-
11', 12', and 13'	28.58	1.37	s	9
1''	98.94	5.52 to 5.50	m	1
2''	71.71	3.64 to 3.53	m	2
3''	59.74	3.19	s	3
4''	60.66	3.21	s	3

<sup>a</sup> The chemical shifts are referenced against the signal of acetonitrile,  $\delta$ : 1.32 ppm.

<sup>b</sup> The chemical shifts are referenced against the signal of acetonitrile,  $\delta$ : 1.94 ppm.

<sup>c</sup> s: singlet, d: doublet, t: triplet, br: broad, m: multiplet

### 3) DS80100717 の分解機構

DS80100717 の強制劣化試験の結果、種々条件下で多くの分解生成物が認められた。分解生成物の化学構造と推定される分解機構を Figure 3 に示す。同定された分解生成物の化学構造に基づいて、DS80100717 の分解に対して感受性を示す反応部位を Figure 6 に示すように推定した。DS80100717 は固体及び溶液の両方において、加水分解（酸及び塩基）及び過酸化水素を介した酸化を受け易かった。既報<sup>24),25),26)</sup>において、他のタキサン誘導体は DS80100717 と同様に C13 位の側鎖が塩基性条件下で加水分解を受けていた。他のタキサン誘導体では C10 位及び C3 位-C11 位架橋の酸化が報告<sup>24),26)</sup>されているが、DS80100717 は異なる反応部位で *N*-oxide 酸化体を形成した。更に、paclitaxel 及び docetaxel の C7 位の  $\beta$ -OH は、レトローアルドール反応の結果として  $\alpha$ -OH に容易にエピマー化する事が報告<sup>24),25)</sup>されているが、DS80100717 は側鎖 C2'位が容易にエピマー化した。DS80100717 側鎖の oxacetane 基は、他のタキサン誘導体の benzyl 基と比べて立体障害が小さいため、側鎖 C2'位でエピマー化を受け易いと考えられた (Figure 1)。なお docetaxel 側鎖の C2'エピマー体はマイナーな工程不純物として報告されている<sup>32)</sup>。*N*-oxide 体及び C2'エピマー体は、タキサン誘導体の分解生成物としてこれまで報告されていない新規分解生成物であった。

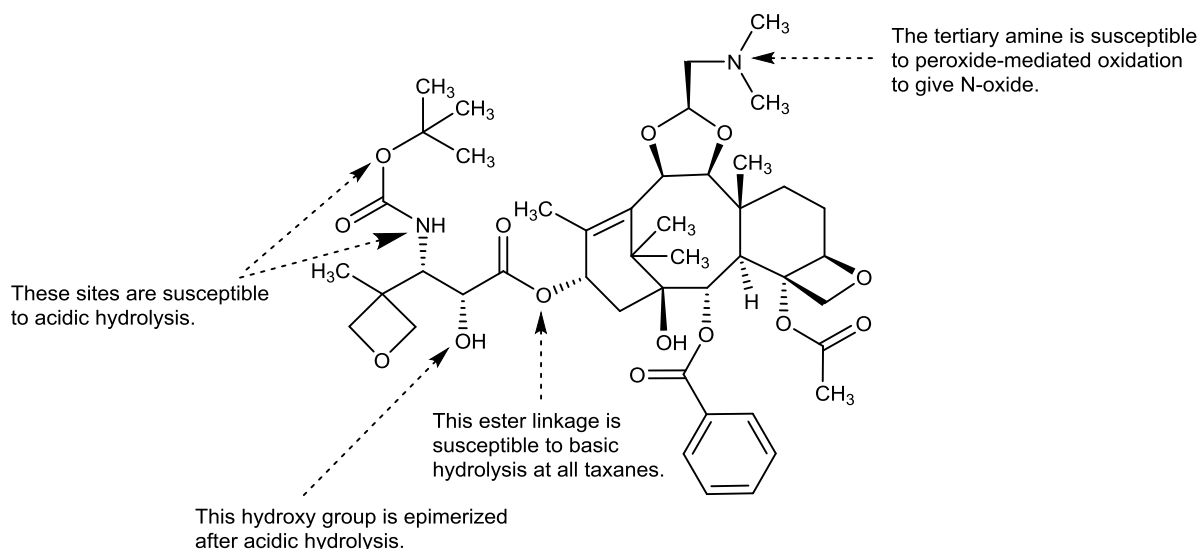


Figure 6 Summary of the Reactive Sites of DS80100717

## 6. 結論

DS80100717 原薬及び凍結乾燥製剤において、強制劣化試験を実施し、その主要な分解生成物を評価した。8つの分解生成物を単離し、MS及びNMRを含む種々のスペクトル解析技術を用いて化学構造を同定した。分解生成物の *N*-oxide 体と C2'エピマー体は原薬や製剤の固体状態の強制劣化試験でも観察されており、実際の長期安定性試験においても生成する可能性が高い。本研究では主分解生成物を適切な強制劣化試験で見出すことが出来た。加えて *N*-oxide 体と C2'エピマー体は他タキサン系医薬品では認められない新規の分解機構であった。これらの分解生成物は、医薬品の開発及び原薬及び製剤の品質管理において重要と考えられた。

## 第二章：ステアリン酸マグネシウム含量が薬物分解速度に及ぼす影響と拡張型アレニウス式を用いたモデル化

### 1. 要旨

製薬業界では医薬品の開発加速化のために、安定性試験の短縮と改善に取り組んでいる。その一つとして、原薬及び製剤の加速及び苛酷試験において、湿度補正したアレニウス式を活用した短期安定性評価プログラム (Accelerated Stability Assessment Program (ASAP)) が提案されている。本研究では、ASAP を用いて薬物と添加剤との配合変化試験をモデルとして、アセチルサリチル酸の化学的安定性に及ぼすステアリン酸マグネシウム (MgSt) 含有量の影響を評価した。アセチルサリチル酸混合末では、温度及び相対湿度は反応速度定数の自然対数に対して一次線形性の応答を示したのに加え、MgSt 含有量も一次線形性の応答を示した。この関係から、温度、相対湿度、及び MgSt 含有量を独立変数とした多項式モデルを構築した。モデルのあてはまりの指標である決定係数 ( $R^2$ ) は 0.9567 であり、良好な予測モデルと判断した。長期安定性試験(25 °C/60% RH、6 ヶ月)においては、類縁物質総量の実測値とモデルからの予測値の良好な相関が認められた。本分解機構においては、添加剤表面の局所的 pH の影響により、温度及び相対湿度に依存せずに分解反応が進行したと考えられた。本モデル式を適用する事で、製剤の処方設計や安定性試験の検討期間が大幅に短縮でき、医薬品開発における期間短縮とコスト削減が期待できる。

### 2. 緒言

原薬及び製剤の承認申請においては、ICH Q1A(R2)ガイドライン<sup>1)</sup>に基づいて安定性試験を実施する必要がある。ICH ガイドラインに基づく安定性試験においては、実際の保存を想定した長期安定性試験は時間が掛かり、加速試験や苛酷試験からは長期安定性試験への外挿が困難といった問題がある。画期的な新薬に対する開発加速化のための審査制度の短縮が各国規制当局で取り組まれているが<sup>5)</sup>、安定性試験の短縮における製品の品質変化に対する理解が進んでいない。また、Phase I のような開発初期段階においては非常に短期間の安定性試験での申請も認められている事から<sup>33)</sup>、医薬品開発の生産性を高めるためには、短期安定性試験からの精度の良い安定性予測の開発が極めて重要である。

化学反応の反応速度定数と温度の相関関係としてアレニウス式が知られており、医薬品

の安定性評価に用いられてきた。しかしながら、湿度も医薬品の安定性の重要な因子であるが、アレニウス式では湿度の影響が評価できないという問題を抱えていた。これに対し、Waterman らによって湿度補正アレニウス式（式 1（再掲））が提案され、安定性予測の精度の短縮・向上を目指した短期安定性評価プログラム（Accelerated Stability Assessment Program (ASAP)）が報告されている<sup>13),14)</sup>。

$$\ln k = \ln A - E_a/(R \cdot T) + B(\%RH) \quad (1)$$

ここで、 $k$  は反応速度定数、 $A$  は頻度因子、 $E_a$  は活性化エネルギー、 $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度、 $B$  は湿度に影響する因子、及び%RH は相対湿度を表す。本モデル式は経験式ではあるものの医薬品において良く当てはまる事が報告されており<sup>14)</sup>、温度及び相対湿度を様々に変えた短期安定性試験の結果に基づいて、任意の温度及び相対湿度の長期保存における安定性を評価可能である。

化学的安定性におけるアレニウス式の拡張として、主薬の含有量及び接触表面積の影響<sup>34),35)</sup>、固体分散体における反応性添加剤の含有量の影響<sup>36)</sup>、オイル成分を含むカプセルにおける酸素濃度の影響<sup>37)</sup>、saxagliptin 製剤におけるポリエチレングリコール中の反応性不純物量の影響<sup>38)</sup>が報告されている。また速放性製剤の物理的変化による溶出遅延の短期安定性評価も報告されている<sup>39)</sup>。様々な不安定化因子をアレニウス式に組み込む事で、より迅速かつ高精度に医薬品品質を理解する取り組みが進められている<sup>40)</sup>。

薬物と添加剤成分との配合変化については、多くの事例が報告されている<sup>41)</sup>。特に製剤の滑沢剤として一般的に使用されているステアリン酸マグネシウム（MgSt）においては、アセチルサリチル酸<sup>42)</sup>、エプラジノン塩酸塩<sup>43)</sup>、及びアンジオテンシン変換酵素阻害薬<sup>44),45)</sup>など多くの薬物と化学的に配合変化が起こる事が報告されている。加えて、MgSt は弱イオン化性薬物の塩形態において脱塩化などの物理的変化を引き起こすことが知られている<sup>46),47)</sup>。医薬品における MgSt との化学的相互作用について多くの事例が報告されているが、迅速な製剤設計と安定性予測を目的として、複数の不安定化因子をアレニウス式に拡張して理論的に予測した事例は報告されていない。本研究では、製剤成分中における MgSt 含有量に着目し、化学的安定性に及ぼす MgSt 含有量の影響を評価した。また、分解要因（温度、相対湿度、及び MgSt 含有量）と反応速度との相関を拡張型アレニウス式でモデル化し、実際の長期安定性試験への外挿を試みた



### 3. 実験

#### 1) 試薬

アセチルサリチル酸 (Figure 7) は特級グレードを関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。D-マンニトール Parteck M200 は Merck KGaA (Darmstadt, Germany) から購入した。MgSt NF NON-BOVINE HyQual は Mallinckrodt Pharmaceuticals (Dublin, Ireland) から購入した。塩化リチウム、塩化マグネシウム六水和物、臭化ナトリウム、及び塩化ナトリウムは関東化学株式会社より特級グレードを購入した。Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2.0~12.0、イオン強度: 1.0) は、Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) から特級グレードを購入した。特級グレードのリン酸、及び HPLC グレードのアセトニトリルは関東化学工業株式会社より購入した。精製水は LC/MS 用グレードを富士フイルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。その他の試薬はいずれも分析グレードの市販品を使用した。

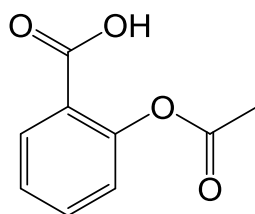


Figure 7 Chemical Structure of Acetylsalicylic Acid

#### 2) アセチルサリチル酸混合末の調製

アセチルサリチル酸混合末の成分および組成を Table 11 に示す。アセチルサリチル酸はボールミル粉砕機 (MM200; RETSCH GmbH, Haan, Germany) を用いて、振とう数 25 Hz で 2 分間粉砕した。粉砕には、2-mL の Eppendorf チューブ (DNA LoBind; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) に 2 個のジルコニウムボール (3 mm i.d.) を用いた。粉砕試料の粉末 X 線回折パターンは回折ピークを示した (未掲載データ)。粉砕したアセチルサリチル酸、D-マンニトール、及び MgSt は日本薬局方 100 号篩い (目開き 150  $\mu\text{m}$ 、Tokyo Screen Co., Ltd., Tokyo, Japan) で篩過した。これらを Table 11 に示す割合でメノウ乳鉢上に秤量し、乳棒で混合した。10-mL のスクリュウキャップ付き GC ガラスバイアルに混合末試料を 20 mg ずつ取り分けて、各劣化条件で保存した。調製後の混合末試料は  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍庫で保存した。

MgSt はステアリン酸とパルミチン酸のマグネシウム塩の混合組成からなり、製造会社

や製造ロット毎に物理的性質が異なることが報告されている<sup>48)</sup>。本分解機構においてもロット間差が生じうると推測されたため、本研究では同じメーカー及び同じロットの MgSt を使用した。また、製剤に用いられる MgSt 含有量は、一般的に全重量比で約 1% であるが、本研究では良好な含量均一性を確保しつつ、分解に対する MgSt 含有量の影響を広い範囲で評価するために高濃度で調製した。

Table 11 Components and Composition of Acetylsalicylic Acid Powder Blends

Components and Composition	1	2	3	4	5
Acetylsalicylic Acid (g) (for a drug substance)	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
D-mannitol (g) (for a bulking agent)	80.0	79.0	78.0	77.0	76.0
Magnesium stearate (g) (for a lubricant)	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0
Magnesium stearate to total weight ratio (% (w/w))	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0
Magnesium stearate to acetylsalicylic acid ratio (% (w/w))	0.0	5.0	10.0	15.0	20.0

### 3) 固体におけるアセチルサリチル酸混合末の安定性試験

5 種類の MgSt 含有量 (%MgSt; 0% (w/w)、1% (w/w)、2% (w/w)、3% (w/w)、及び 4% (w/w)) の混合末について、3 温度条件 (35 °C、40 °C、及び 50 °C) 及び 4 相対湿度条件 (約 10% RH、約 30% RH、約 50% RH、及び約 75% RH) に最大 10 日間保存した。全ての保存条件において、密閉ガラス瓶中に試料と飽和塩溶液入れ、温度制御された恒温庫で保存した。相対湿度のコントロールには、塩化リチウム飽和溶液を用いて約 10% RH、塩化マグネシウム六水和物飽和溶液を用いて約 30% RH、飽和臭化ナトリウム溶液を用いて約 50% RH、及び塩化ナトリウム飽和溶液を用いて約 75% RH に調整した。加えて、温度/湿度ロガー (KT-255U, Fujita Electric Works, Ltd, Kanagawa, Japan) を使用して、実際の温

度及び相対湿度データを取得した。長期安定性試験については、25 °C/60% RH 条件下、1 ヶ月から 6 ヶ月まで温度/湿度コントロール室で試料を保存した。

劣化及び非劣化混合末試料は、約 8 mL の水/アセトニトリル混液 (1:1(v/v)) を加え、5 分間超音波処理した。この溶液を 0.45 µm メンブランフィルター (Millex-LCR hydrophilic polytetrafluoroethylene membrane, Merck KGaA) でろ過した。初めのろ液 1 mL を捨て、残りのろ液を採取した。試料溶液は 0.5 mg/mL の濃度に調整した。

#### 4) 溶液におけるアセチルサリチル酸の安定性試験

アセチルサリチル酸を、水/アセトニトリル混液 (1:1(v/v)) を用いて溶解し、Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2.0~pH12.0、イオン強度:1.0) と混合し、1.0 mg/mL の濃度に調整した。この溶液を 40 °C で保存し、定期的にサンプリングした。保存後の試料溶液は水/アセトニトリル混液 (1:1(v/v)) で 2 倍希釈して HPLC 分析した。

### 4. 測定

#### 1) HPLC 分析

HPLC 分析には、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を搭載した島津 Nexera X2 LC システム (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を用いた。分析カラムとして ACQUITY UPLC BEH C8 (2.1 mm i.d. × 75 mm, 粒子径 1.7 µm、Waters Corporation, Milford, MA, USA) を用いた。カラムオープンの温度は 40 °C とした。UV 検出波長は 227 nm に設定した。移動相 A は 5 mmol/L りん酸水溶液、移動相 B はアセトニトリルを使用した。流速は 0.5 mL/min とした。溶媒グラジエント溶出は、移動相 B の割合を時間で変化させて次のステップ勾配とした。T (min)/%移動相 B = 0/5, 5/85, 10/85, 10.1/5, 14/5。注入量は 2 µL とした。データ取得には Empower 3 (Waters Corporation) を用いた。

#### 2) 分解速度の統計解析とモデル式の構築

分解速度の統計解析及びモデル式の構築は、既報<sup>49)</sup>に基づいて JMP version 14.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用した。分解速度は、各保存条件の分解物量に対する時間の傾きから算出した。モデル式を構築は、Ln  $k$  に対して温度 ( $-1/T$ )、%RH、及び%MgSt を変数として、標準最小二乗法及びてこ比効果による重回帰分析により、一般化線形モデルで当てはめを実施した。

## 5. 結果及び考察

### 1) アセチルサリチル酸混合末の固体安定性

種々の保存条件下でのアセチルサリチル酸混合末の固体安定性の結果を Table 12、13、及び 14 に示す。アセチルサリチル酸混合末の固体安定性試験の代表的な HPLC クロマトグラムを Figure 8 に示す。一次分解生成物としてエステルの加水分解物であるサリチル酸（相対保持時間 = 1.09）が認められ、その他にも多くの分解生成物が認められた。これらの二次分解生成物は、既報<sup>42)</sup>において多量体と推定されているが、いずれもサリチル酸由来であり、類縁物質総量約 20 area% までは 0 次反応の分解が認められると報告されている。そこで本研究では、アレニウス式の外挿として類縁物質総量に着目し、各保存条件における分解速度を検証した。また、各保存条件における劣化後の代表的な混合末の粉末 X 線回折パターンにおいては、開始時の混合末と同じ位置に回折ピークを認めた (Figure 9)。

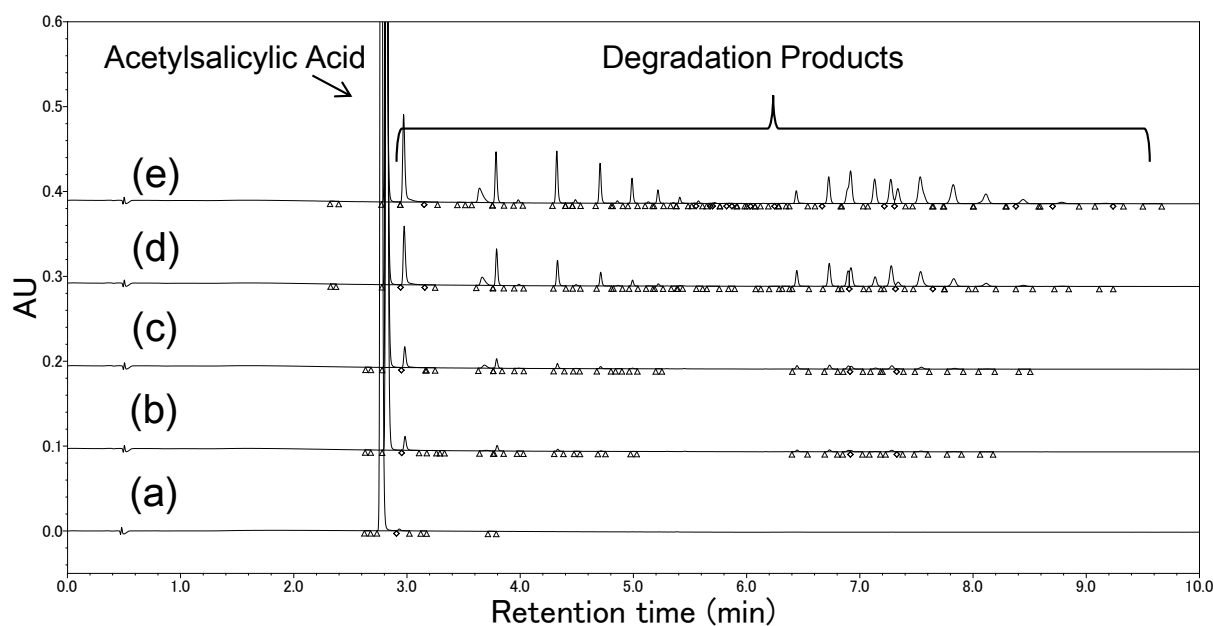


Figure 8 Representative HPLC Chromatograms of Acetylsalicylic Acid Powder Blends with 4% w/w Magnesium Stearate. (a) Initial, (b) 35 °C/12% RH for 7 days, (c) 35 °C/30% RH for 7 days, (d) 35 °C/47% RH for 7 days, (e) 35 °C/76% RH for 7 days

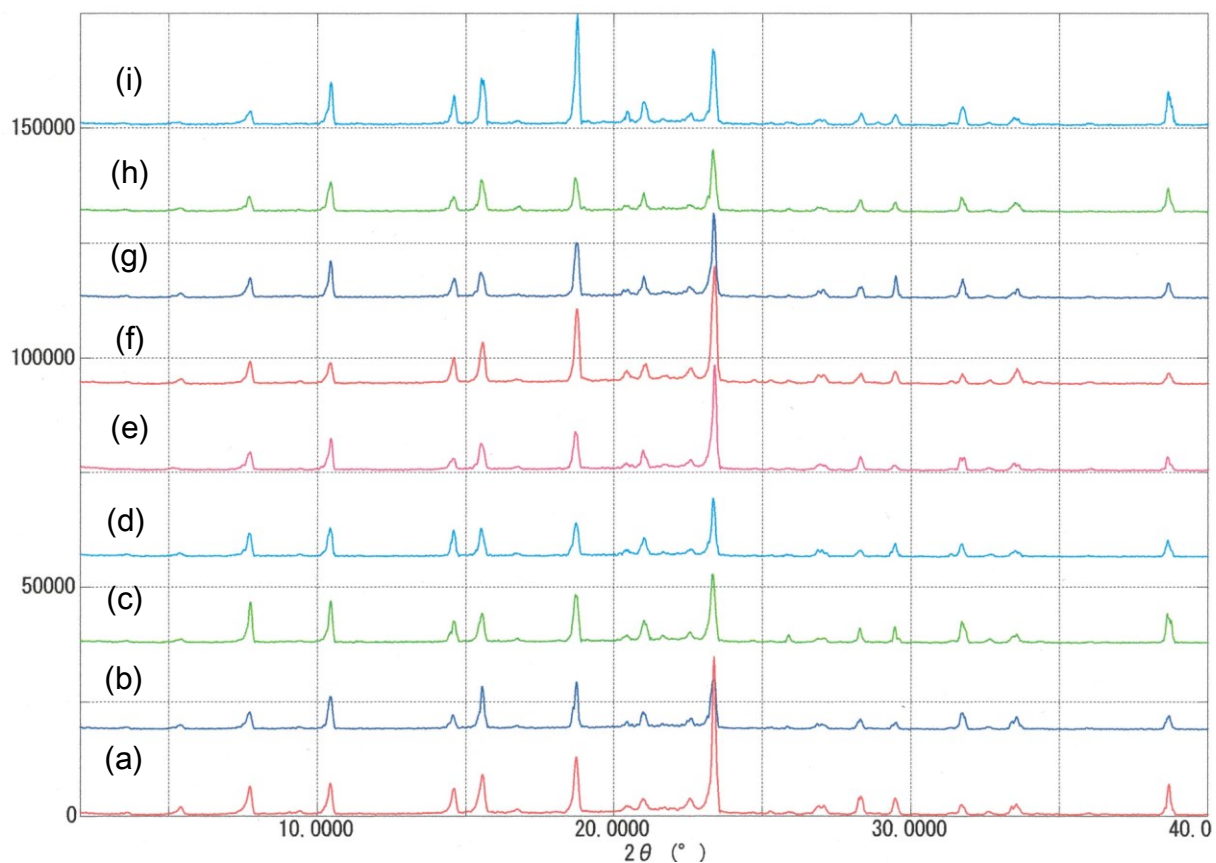


Figure 9 Representative X-Ray Powder Diffraction Patterns of Acetylsalicylic Acid Powder Blends with 4% w/w Magnesium Stearate. (a) Initial, (b) 50 °C/11% RH for 6 h, (c) 50 °C/30% RH for 3 h, (d) 50 °C/47% RH for 3 h, (e) 50 °C/76% RH for 3 h, (f) 40 °C/13% RH for 2 days, (g) 40 °C/32% RH for 2 days, (h) 40 °C/44% RH for 1 day, (i) 40 °C/77% RH for 1 day

Table 12 Results of the Stability Studies of Acetylsalicylic Acid Powder Blends  
in Solid-State at 35 °C

Total related substances (%)		Time point (Day)				<i>k</i> (day <sup>-1</sup> )
		0	3	7	10	
MgSt 0%	12% RH	0.56	0.56	0.61	0.76	0.0190
	30% RH	0.56	0.54	1.01	1.23	0.0740
	47% RH	0.56	0.69	0.97	1.59	0.0985
	76% RH	0.56	0.66	1.11	1.88	0.1293
MgSt 1%	12% RH	0.56	0.80	0.99	1.54	0.0910
	30% RH	0.56	0.87	2.13	2.51	0.2116
	47% RH	0.56	0.91	2.24	3.77	0.3226
	76% RH	0.56	1.02	3.44	–	0.4219
MgSt 2%	12% RH	0.56	1.01	1.60	2.11	0.1540
	30% RH	0.56	1.04	2.33	3.44	0.2928
	47% RH	0.56	1.31	3.56	5.02	0.4621
	76% RH	0.56	1.37	4.76	–	0.6134
MgSt 3%	12% RH	0.56	1.05	2.15	3.75	0.3129
	30% RH	0.56	1.31	3.31	4.54	0.4121
	47% RH	0.56	1.86	4.97	6.32	0.6038
	76% RH	0.56	2.88	5.76	–	0.7416
MgSt 4%	12% RH	0.56	1.26	2.87	3.66	0.3228
	30% RH	0.56	1.49	3.87	7.54	0.6838
	47% RH	0.56	2.78	6.33	10.77	1.0030
	76% RH	0.56	3.16	10.45	–	1.4350

Table 13 Results of the Stability Studies of Acetylsalicylic Acid Powder Blends  
in Solid-State at 40 °C

Total related substances (%)		Time point (Day)				<i>k</i> (day <sup>-1</sup> )
		0	1	2	3	
MgSt 0%	13% RH	0.56	1.23	1.69	1.58	0.3520
	32% RH	0.56	1.34	1.70	3.51	0.9210
	44% RH	0.56	1.65	2.51	3.73	1.0370
	77% RH	0.56	1.89	4.70	8.92	2.7890
MgSt 1%	13% RH	0.56	1.54	2.63	4.13	1.1800
	32% RH	0.56	1.68	3.19	4.50	1.3330
	44% RH	0.56	1.91	3.51	7.07	2.1130
	77% RH	0.56	2.22	6.18	12.20	3.8880
MgSt 2%	13% RH	0.56	1.77	3.02	4.77	1.3880
	32% RH	0.56	2.15	3.97	6.83	2.0630
	44% RH	0.56	2.41	4.74	9.42	2.8910
	77% RH	0.56	2.60	5.13	15.33	4.6840
MgSt 3%	13% RH	0.56	2.04	3.78	5.32	1.6020
	32% RH	0.56	2.77	4.94	7.64	2.3410
	44% RH	0.56	2.82	6.97	10.03	3.2560
	77% RH	0.56	2.95	10.77	19.97	6.6050
MgSt 4%	13% RH	0.56	2.74	5.32	7.35	2.2950
	32% RH	0.56	3.99	5.03	9.08	2.6600
	44% RH	0.56	3.40	6.74	15.07	4.6870
	77% RH	0.56	3.17	13.65	24.80	8.3200

Table 14 Results of the Stability Studies of Acetylsalicylic Acid Powder Blends  
in Solid-State at 50 °C

Total related substances (%)		Time point (Day)									<i>k</i> (day <sup>-1</sup> )
		0	0.125	0.25	0.375	0.667	1	2	4	8	
MgSt 0%	11% RH	0.56	–	–	–	–	–	7.25	11.65	21.92	2.618
	33% RH	0.56	–	–	–	–	–	13.34	21.03	–	5.118
	48% RH	0.56	–	–	–	–	13.34	18.43	–	–	8.935
	75% RH	0.56	–	–	–	–	18.40	26.46	–	–	12.950
MgSt 1%	12% RH	0.56	0.96	1.83	2.77	6.75	–	16.56	–	–	8.271
	30% RH	0.56	–	–	4.78	12.43	–	20.17	–	–	9.494
	47% RH	0.56	–	–	6.72	15.43	–	–	–	–	22.020
	76% RH	0.56	2.63	–	8.00	21.74	–	–	–	–	31.540
MgSt 2%	12% RH	0.56	1.26	2.75	4.27	8.97	–	23.66	–	–	11.820
	30% RH	0.56	–	–	5.87	12.35	–	–	–	–	17.510
	47% RH	0.56	3.13	9.20	10.34	25.17	–	–	–	–	36.790
	76% RH	0.56	3.15	–	15.78	–	–	–	–	–	42.010
MgSt 3%	12% RH	0.56	1.57	2.56	8.25	7.78	–	–	–	–	12.390
	30% RH	0.56	5.00	9.64	14.66	–	–	–	–	–	37.550
	47% RH	0.56	4.40	13.02	16.72	–	–	–	–	–	45.680
	76% RH	0.56	6.22	–	19.81	–	–	–	–	–	51.770
MgSt 4%	12% RH	0.56	1.19	2.51	6.43	–	–	–	–	–	13.070
	30% RH	0.56	2.85	–	18.43	–	–	–	–	–	49.750
	47% RH	0.56	5.37	15.72	–	–	–	–	–	–	60.640
	76% RH	0.56	9.09	27.19	–	–	–	–	–	–	71.210



一定相対湿度（約 50% RH）及び一定%MgSt（4% (w/w)）における、類縁物質総量と保存期間との相関関係を Figure 10 に示す。類縁物質総量の増加に対して最大約 20 area%まで 0 次分解挙動が認められ、検証した温度範囲においては類縁物質総量と保存期間との間に一次線形性の応答が認められた。一定温度（35 °C）及び一定%MgSt（3% (w/w)）における、類縁物質総量と保存期間との相関関係を Figure 11 に示す。類縁物質の総量増加に対して 0 次分解挙動が認められ、検証した%RH 範囲においては類縁物質総量と保存期間との間に一次線形性の応答が認められた。加えて、これまでに報告<sup>13)</sup>されているように、温度（1/T）及び%RH は  $k$  の自然対数である  $\ln k$  に対して一次線形応答を示した。従って、本分解機構においては、 $\ln k$  に対して温度及び%RH を一次関数として湿度を補正したアレニウス式でモデル化できる事が示唆された。各温度/%RH における%MgSt に対する  $\ln k$  の相関関係を Figure 12 に示す。%MgSt は  $\ln k$  に対して一次線形応答を示したことから、%MgSt はアレニウス式で一次関数としてモデル化できる事が示唆された。

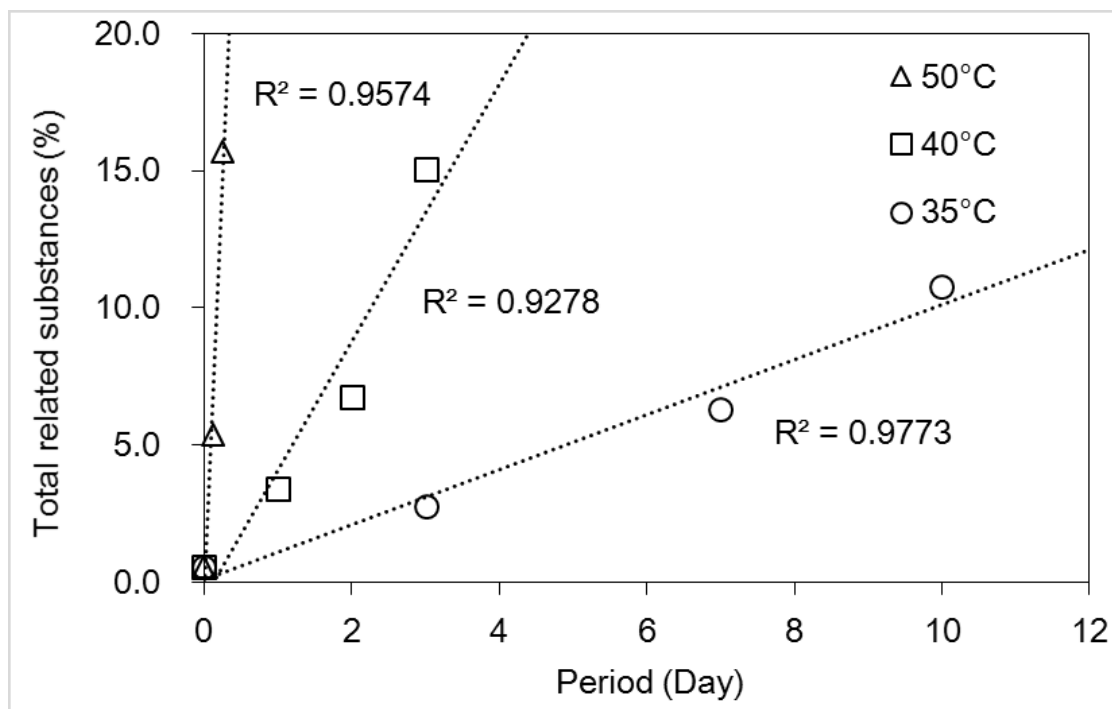


Figure 10 Effect of Temperature on Degradation Level at 50% RH (4% w/w Magnesium Stearate)

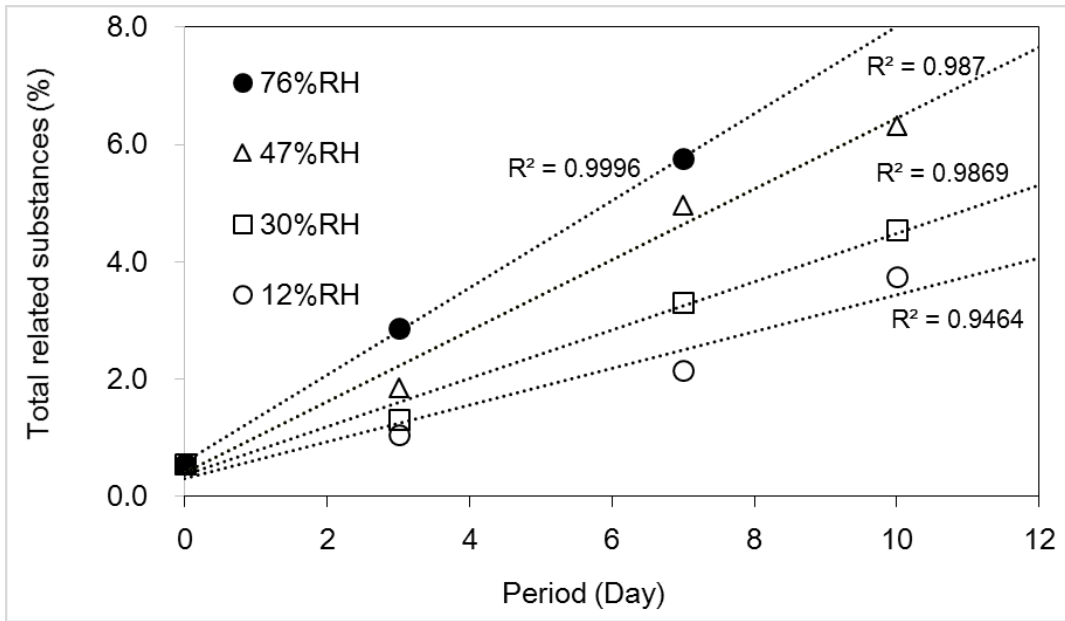


Figure 11 Effect of Related Humidity on Degradation Level at 35 °C (3% w/w Magnesium Stearate))

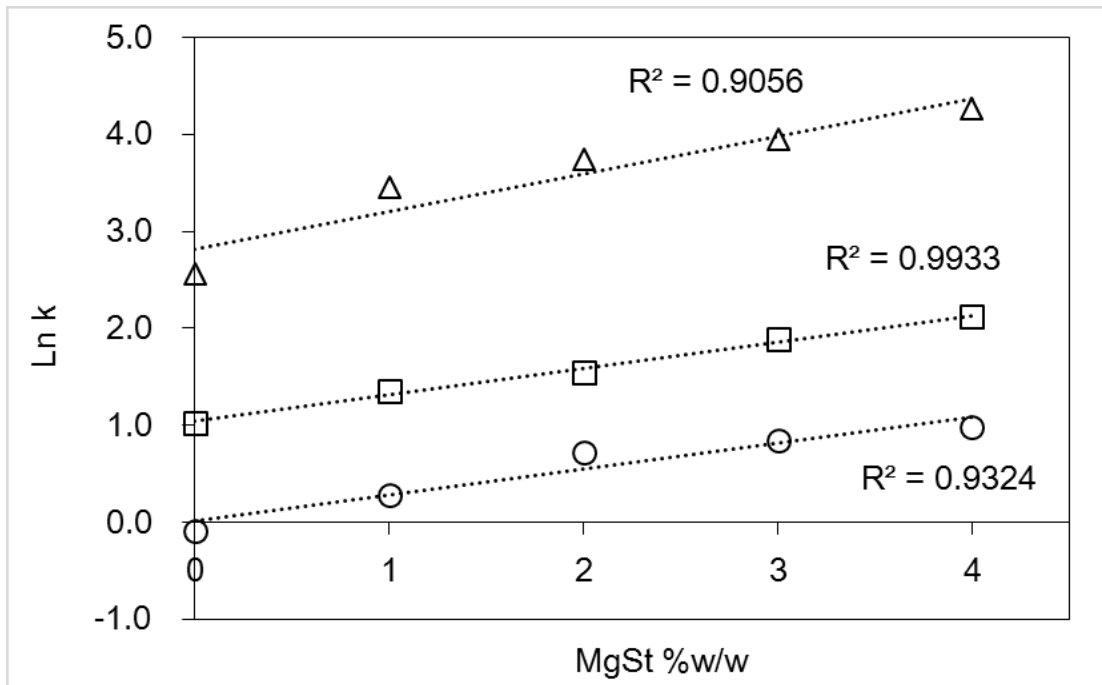


Figure 12 Relationship between Ln k and Magnesium Stearate Content (% w/w) at Fixed Temperature and Related Humidity Conditions. (O: 40 °C/32% RH, □: 40 °C/77% RH, :Δ 50 °C/75% RH)

## 2) アセチルサリチル酸混合末の拡張型アレニウス式でのモデリング

各温度/%RH の計 60 条件下 (Table 12~14) で得られた  $k$  に対して、統計解析ソフトウェア JMP を用いて湿度を補正したアレニウス式に %MgSt を変数として加えたモデルの解析結果を Figure 13 及び Table 15 に示す。実験における  $\ln k$  と %MgSt の相関関係から、全ての因子について一次線形モデルへの適合性を評価した。結果、 $k$  に影響する因子の寄与を示す  $p$  値は、全ての因子で  $p < 0.0001$  であり有意に寄与していた。構築したモデルの当てはまりの度合いを示す決定係数 ( $R^2$ ) は 0.9567 であり、 $\ln k$  残基プロットは均一に分布していた (Figure 13)。モデル正確性の尺度を示す、二乗平均平方根誤差 (RMSE) は 0.4185 であり、このモデルに良く適合した。以上より、式 (2) で表される  $1/T$ 、%RH、及び %MgSt が独立変数の多項式モデルを提案した。

$$\ln k = \ln A - E_a/(R \cdot T) + B(\%RH) + C(\%MgSt) \quad (2)$$

ここで、 $C$  は %MgSt に影響する係数である。本実験では Table 15 の結果より、活性化エネルギー  $E_a = 54.4$  ( $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ )、%RH 定数  $B = 0.0227$ 、%MgSt 係数  $C = 0.4465$  が計算された。温度が分解速度に最も大きな影響を及ぼし、%MgSt が次に大きく影響する事が確認された。一方、 $1/T$  及び %RH を用いてモデル化した場合、 $R^2$  は 0.8512 であり、予測モデルとして精度が劣る事が確認された (Table 15)。更に、 $1/T$ 、%RH、及び %MgSt の交互作用を含むモデルを評価した結果、 $R^2$  は 0.9579 で僅かに改善した (Table 16)。しかしながら、非常に複雑なモデル式であり、各交互作用の  $p$  値は有意ではなかった ( $p > 0.4$ ) ことから、モデル式として不相当と判断した。

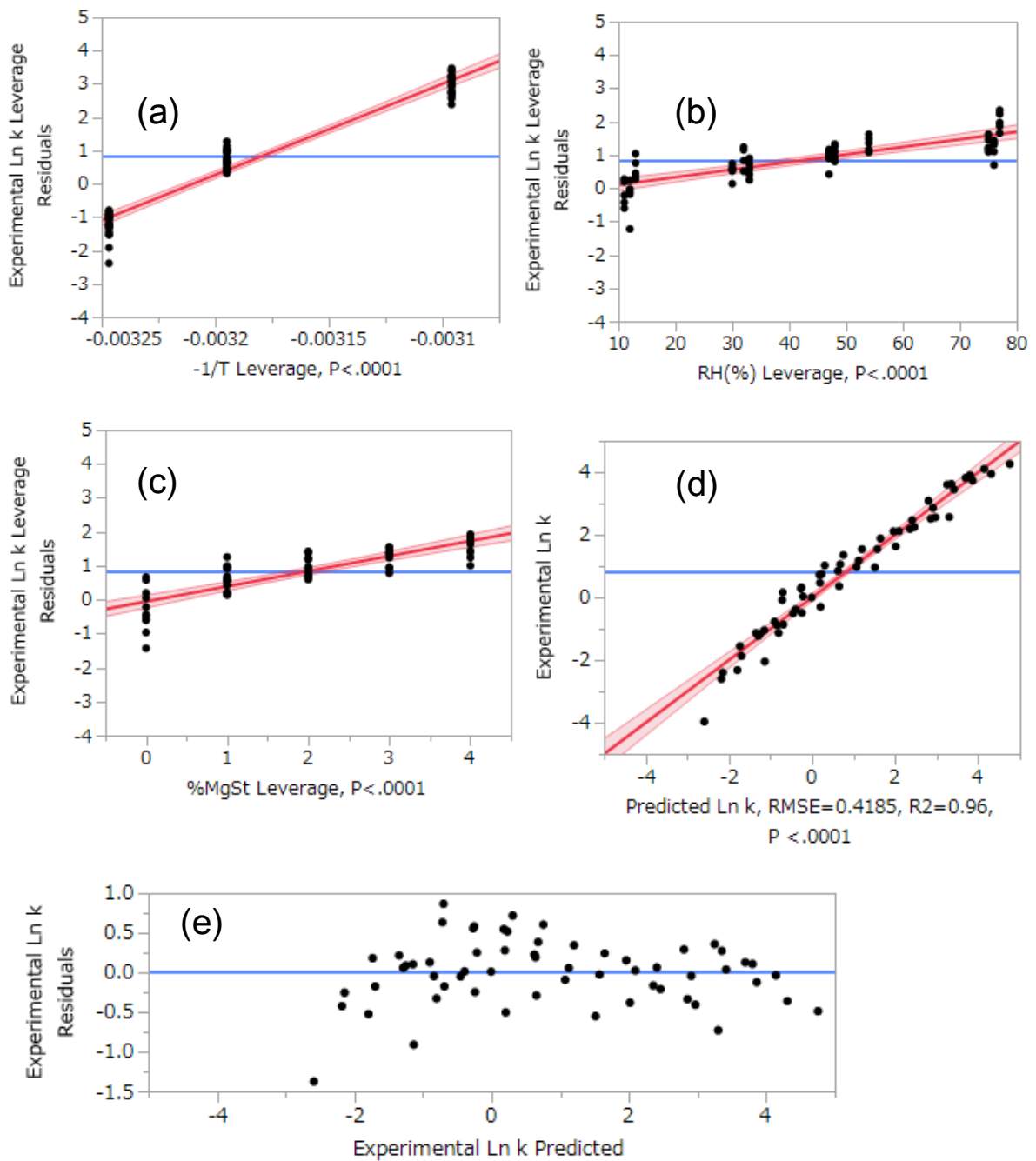


Figure 13 Results of Statistical Modeling using Multiple Linear Regression

Analysis

(a) Effect leverage plot of  $-1/T$  on  $\ln k$ ; (b) Effect leverage plot of %RH on  $\ln k$ ; (c) Effect leverage plot of %MgSt on  $\ln k$ ; (d) The plot of the experimental  $\ln k$  versus predicted  $\ln k$ , (e) Experimental  $\ln k$  residual plot

Table 15 Multiple Linear Regression Analysis

	<i>p</i> -values	
	-1/ <i>T</i> and %RH	-1/ <i>T</i> , %RH and %MgSt
Intercept (Ln <i>A</i> )	<0.0001	<0.0001
-1/ <i>T</i>	<0.0001	<0.0001
%RH	<0.0001	<0.0001
% w/w MgSt	–	<0.0001
Coefficients		
Intercept (Ln <i>A</i> )	86.8624	85.9695
-1/ <i>T</i>	27360	27360
%RH	0.0227	0.0227
% w/w MgSt	–	0.4465
Model performance		
$R^2$	0.8512	0.9567
RMSE <sup>a</sup>	0.7692	0.4185

<sup>a</sup> Root mean squared error

Table 16 Multiple Linear Regression Analysis

	<i>p</i> -values
	-1/ <i>T</i> , %RH, %MgSt, (-1/ <i>T</i> ) × %RH, (-1/ <i>T</i> ) × %MgSt, and %RH × %MgSt
Intercept (Ln <i>A</i> )	< 0.0001
-1/ <i>T</i>	< 0.0001
%RH	< 0.0001
% w/w MgSt	< 0.0001
(-1/ <i>T</i> ) × %RH	0.8404
(-1/ <i>T</i> ) × %MgSt	0.4234
%RH × %MgSt	0.3937
Coefficients	
Intercept (Ln <i>A</i> )	85.9868
-1/ <i>T</i>	27366
%RH	0.0227
% w/w MgSt	0.4465
$((-1/T) - (-0.003179)) \times ((\%RH) - 42.3333)$	7.5771
$((-1/T) - (-0.003179)) \times ((\%MgSt) - 2)$	-499.77
$((\%RH) - 42.3333) \times ((\%MgSt) - 2)$	-0.001410
Model performance	
<i>R</i> <sup>2</sup>	0.9579
RMSE <sup>a</sup>	0.4245

<sup>a</sup> Root mean squared error

モデルの妥当性評価のため、長期安定性試験（25 °C/60% RH）条件において、6 ヶ月までの保存期間に対して類縁物質総量をプロットした結果（予測値；点線、実測値；マーカー）を Figure 14 に示す。種々の%MgStにおける類縁物質総量に対し、モデルの予測値と実測値との間で良好な相関が認められた。以上より、式（2）で表されるモデル式は種々の分解要因（温度、%RH、及び%MgSt）の変動に対して、分解速度を精度良く予測可能であると推測された。

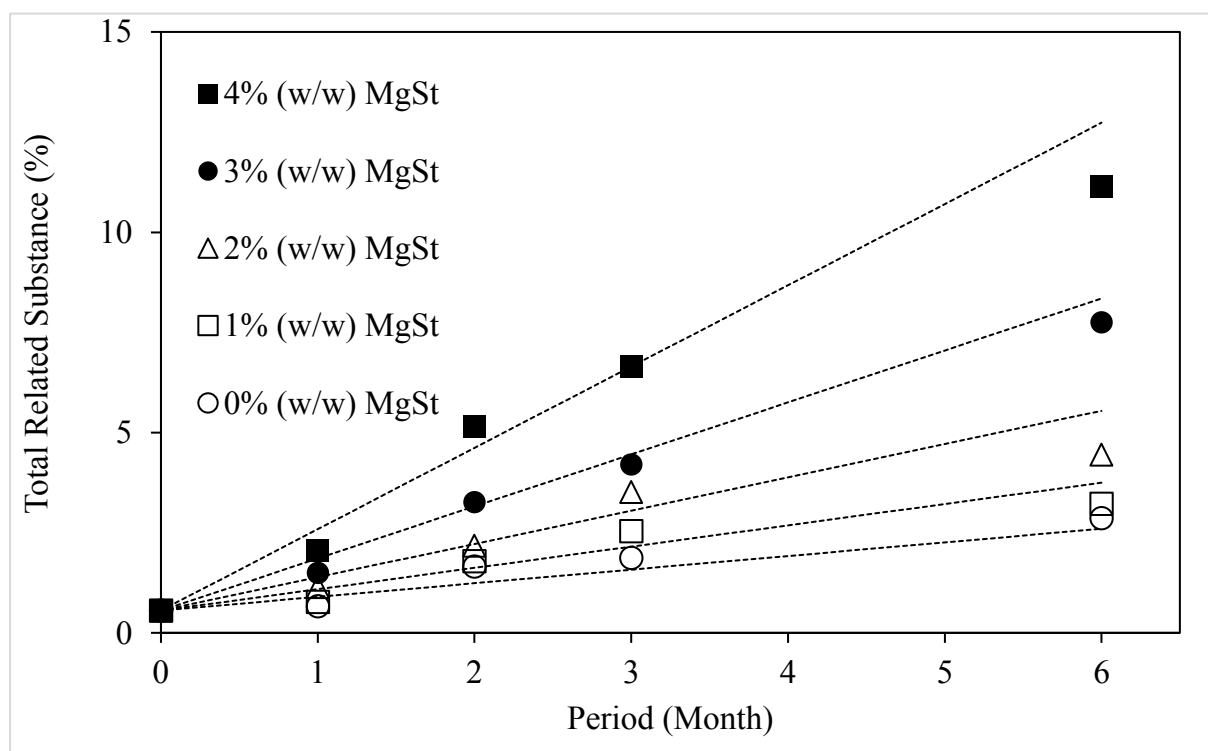


Figure 14 Results of Stability Study of Acetylsalicylic Acid Powder Blends in Solid-State at 25 °C/60% RH

(Dotted lines are a predicted values by the model; Markers are an experimental data)

### 3) 添加剤による薬物分解機構

添加剤 MgSt の分解機構への影響を明らかにするため、各種 pH 条件におけるアセチルサリチル酸の溶液安定性試験の結果を Figure 15 に示す。各条件の分解速度は、類縁物質総量に対する保存期間のプロットの傾きから擬一次速度式を用いて算出した (Table 17)。アセチルサリチル酸は塩基性条件下で顕著に分解しており、加えて MgSt は塩基性添加剤

であることが知られている。この分解機構では、MgSt 表面の局所的 pH が触媒的に影響を及ぼしたため、温度及び湿度と独立して分解が進行したと推察された<sup>50)</sup>。以上の結果より、化学的安定性に及ぼす反応性添加剤の影響について、温度及び湿度に依存しない因子として拡張型アレニウス式に基づいてモデル式を構築した。反応性添加剤の影響を受ける医薬品は多いことから、実際の医薬品の製品開発における処方や保存条件変更に対して、本モデル式を適用する事で、効率的かつ迅速な安定性予測が可能となると考える。

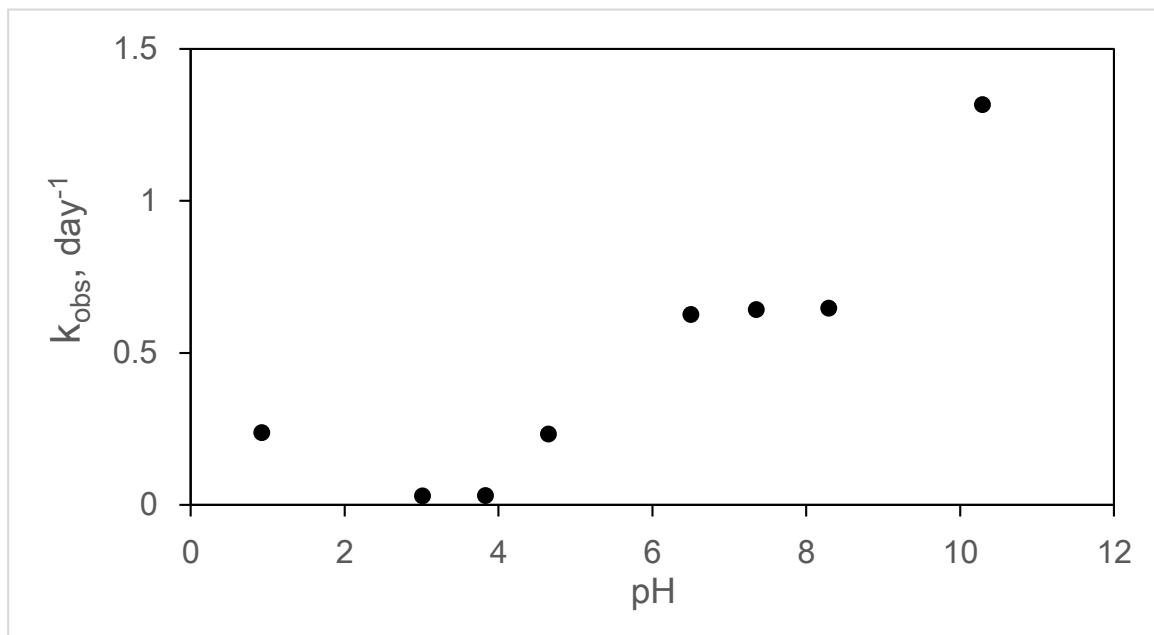


Figure 15 Effect of pH on the Degradation Rate of Acetylsalicylic Acid in Various Buffer Solutions at 40 °C



Table 17 Results of the Stability Studies of Acetylsalicylic Acid in Buffer/Acetonitrile (1:1 (v/v)) at 40 °C

Total related substances (%)	Actual pH	Time point (Day)								$k_{obs}$ (day <sup>-1</sup> )
		0	0.04	0.08	0.17	0.33	1	3	7	
0.1N HCl	0.92	0.56	1.16	1.78	3.28	6.05	16.28	-	-	0.238
Unbuffered water	3.83	0.56	0.80	1.12	1.96	3.25	3.36	9.46	20.23	0.030
	3.01	0.56	0.59	0.68	0.94	1.40	2.88	8.46	19.27	0.031
	4.65	0.56	1.59	2.38	4.41	8.11	19.77	-	-	0.234
Britton-Robinson buffer (ionic strength: 0.2)	6.50	0.56	2.67	4.09	7.86	14.35	-	-	-	0.627
	7.35	0.56	2.67	4.21	8.05	14.74	-	-	-	0.643
	8.29	0.56	2.73	4.33	8.23	14.97	-	-	-	0.648
	10.29	0.56	7.65	12.54	-	-	-	-	-	1.317

## 6. 結論

本研究では、種々の MgSt 含有量のアセチルサリチル酸混合末について、温度、相対湿度、及び MgSt 含有量が分解速度に及ぼす影響をモデル化した。重回帰分析の結果、各因子間で有意な交互作用は認められず、各因子が独立変数の多項式モデルを構築できた。本モデル式は  $R^2 = 0.9567$  であり、良好な予測モデルと判断した。モデル妥当性検証として、長期安定性試験からの実測値（25 °C/60% RH）とモデル式からの予測値を比較したところ、良好な相関が認められた。MgSt は塩基性添加剤であることが知られており、本分解機構においては MgSt 表面の局所的 pH が影響したため、温度及び湿度と独立して分解が進行したと推察された。

今回提示したモデル式は単純であり、評価に用いた混合末も賦形剤を含んで実際の製剤に類似しているため、実用性は高いと考えられる。このモデル式を適用することで、製剤設計及び安定性試験の期間を大幅に短縮でき、医薬品開発における時間とコストを節約できると考える。医薬品開発を加速化し厳しい国際競争を勝ち抜くためには、製薬業界は精度の高い加速化試験の確立や安定性評価の深い理解のためのプラットフォーム構築に取り組む事が重要と考えられた。

## 総括

本研究では医薬品開発において律速となりうる安定性評価について、強制劣化試験により分解機構を効率良く把握する事を検証し、更に添加剤の影響を含めた短期安定性評価の拡張性について検討した。

はじめに、タキサン化合物 DS80100717 をモデルとして、原薬及び凍結乾燥製剤において、強制劣化試験を実施し、主分解生成物及び分解機構を評価した。溶液強制劣化試験の結果、8種類の分解生成物が認められ、MS 及び NMR を含む種々のスペクトル解析技術を用いて化学構造を同定した。このうち、*N*-oxide 体（酸化物）と C2' エピマー体（酸加水分解物）については、原薬や製剤の固体状態の強制劣化試験でも観察されており、実際の長期安定性試験においても生成する可能性が高い事が示唆された。加えて *N*-oxide 体と C2' エピマー体は他タキサン系医薬品では認められない新規の分解生成物であった。以上より、適切な設定条件に基づいて強制劣化試験を実施することで、医薬品の分解要因と主分解生成物を早期に把握し、その分解機構に応じた安定化手法が構築可能である事が示された（第一章）。

次に、製剤の安定性予測におけるアレニウス式の拡張として、添加剤であるステアリン酸マグネシウム（MgSt）との配合安定性が悪いアセチルサリチル酸をモデルとし、化学的安定性に及ぼす反応性添加剤の影響を短期安定性試験に基づいて評価した。アセチルサリチル酸混合末では、温度及び相対湿度は反応速度定数の自然対数に対して一次線形性の応答を示したのに加え、MgSt 含有量も一次線形性の応答を示した。重回帰分析の結果、各因子間で有意な交互作用は認められず、各因子が独立変数の多項式モデルを構築し、良好な精度である事が確認できた。モデル妥当性検証として、長期安定性試験での実測値とモデル式からの予測値を比較したところ、良い一致が認められた。MgSt は塩基性添加剤であることが知られており、本分解機構においては MgSt 表面の局所的 pH が影響したため、温度及び湿度と独立して分解が進行したと推察された。MgSt は添加剤として汎用されており、配合不安定な医薬品も多いことから、本モデル式は製剤処方検討時の安定性評価に有用であると考え（第二章）。

以上より、これらの知見は実際の医薬品の製品開発における処方、包装、及び保存条件変更に対して、本手法の適用により迅速な安定性予測と品質保証を可能とする事を示唆するものである。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始多大なるご指導とご鞭撻を賜りました星薬科大学大学院 薬学研究科 総合薬科学専攻 薬品物理化学研究室 米持悦生教授に深甚なる感謝の意を表します。本論文を提出するにあたり、副査として貴重なご助言を賜りました同専攻 薬品分析化学研究室 斉藤貢一教授、同専攻 医療薬剤学研究室 池内由里准教授に深く感謝申し上げます。また本研究を実施する機会を与えて戴きました第一三共ケミカルファーマ株式会社 監査役 大原求博士、第一三共株式会社 製薬技術本部 分析評価研究所 所長 上代才博士に深く感謝致します。

博士後期課程進学にあたり、また本研究を遂行するにあたり多大なご支援を頂きました第一三共株式会社 信頼性保証本部 品質保証部 品質管理グループ 主幹 小野誠博士、研究を遂行するにあたり貴重なご助言、ご協力を頂きました同社 製薬技術本部 分析評価研究所 研究第五グループ長 川邊武史博士に深く感謝致します。研究を遂行するにあたり貴重なご助言を頂きました同グループ 新木哲也博士、小林克弘博士、篠崎妙子博士に心から感謝申し上げると共に、研究でご協力いただきました同グループ 湯浅寿恵氏にお礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、ご配慮、ご協力いただきました同グループ 鈴木徹也博士、佐藤理江氏、恒松弘基氏、並びに同グループ及び同研究所の皆様にも深く感謝致します。

研究室配属にあたり、また研究を遂行するにあたり貴重なご助言、ご協力を賜りました星薬科大学大学院 薬学研究科 総合薬科学専攻 薬品物理化学研究室 福澤薫准教授、同研究室 古石誉之講師、並びに同研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

最後に、博士後期課程進学及び論文作成に際し、全面的に理解と支援をしてくれた妻 夏子、娘 海、及び家族の皆様にも心から感謝いたします。

## 引用文献

- 1) International Conference on Harmonization (ICH). Topic Q1A (R2):"Stability Testing of New Drug Substances and Products." : <<http://www.ich.org/>>, cited 6 February, 2003.
- 2) International Conference on Harmonization (ICH). Topic Q1B:"Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products." : <<http://www.ich.org/>>, cited 6 November, 1996.
- 3) International Conference on Harmonization (ICH). Topic Q3A (R2):"Impurities in New Drug Substances." : <<http://www.ich.org/>>, cited 25 October, 2006.
- 4) International Conference on Harmonization (ICH). Topic Q3B (R2):"Impurities in New Drug Products." : <<http://www.ich.org/>>, cited 2 June, 2006.
- 5) Nagai S., Flexible and Expedited Regulatory Review Processes for Innovative Medicines and Regenerative Medical Products in the US, the EU, and Japan Int. J. Mol. Sci., 20, 3801 (2019).
- 6) Kishimoto T.K., Viswanathan K., Ganguly T., Elankumaran S., Smith S., Pelzer K., Lansing J.C., Sriranganathan N., Zhao G., Galcheva-Gargova Z., Al-Hakim A., Bailey G.S., Fraser B., Roy S., Rogers-Cotrone T., Buhse L., Whary M., Fox J., Nasr M., Pan G.J.D., Shriver Z., Langer R.S., Venkataraman G., Austen K.F., Woodcock J., Sasisekharan R., Outbreak of Adverse Reactions Associated With Contaminated Heparin. N Engl J Med., 358, 2457-2467 (2008).
- 7) Gerber C., Heinz-Gerhard Toell HG., What happened: The chemistry side of the incident with EMS contamination in Viracept tablets. Toxicology Letters., 190, 248-253 (2009).
- 8) Snodin DJ., Elder DP., Short commentary on NDMA (N-nitrosodimethylamine) contamination of valsartan products. Regulatory Toxicology and Pharmacology., 103, 325-329 (2019).
- 9) Mahase E., FDA recalls ranitidine medicines over potential cancer causing impurity. BMJ., 367, 15832 (2019).
- 10) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬安全対策課事務連絡、メトホルミン塩酸塩における発がん性物質に関する分析について（依頼）、令和元年12月9日、Available at: <https://www.pmda.go.jp/files/000232925.pdf>
- 11) International Conference on Harmonization (ICH). Topic M7 (R1):" Assessment and

Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk." : <<http://www.ich.org/>>, cited 31 March, 2017.

- 12) Varisure., Valisure Citizen Petition on Ranitidin, September 9 (2019). Available at: <https://www.valisure.com/wp-content/uploads/Valisure-Ranitidine-FDA-Citizen-Petition-v4.12.pdf>
- 13) Waterman KC., Adami RC., Accelerated Aging: Prediction of Chemical Stability of Pharmaceuticals. *Int J Pharm.*, 293, 101-125 (2005).
- 14) Waterman KC., Carella AJ., Gumkowski MJ., Lukulay P., MacDonald BC., Roy MC., Shamblin SL., Improved Protocol and Data Analysis for Accelerated Shelf-Life Estimation of Solid Dosage Forms. *Pharm Res.*, 24, 780-790 (2007).
- 15) Miyamoto K., Matsuzaki K., Takimoto N., Introduction of Lean Stability Strategy. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science.*, 50, 788-793 (2019).
- 16) McMahon M., Williams H., Debie E., Fu M., Bujalski R., Qiu F., Wu Y., Li H., Wang J., Hoaglund-Hyzer C., Pulliam D., Utilization of risk-based predictive stability within regulatory submissions; industry's experience. *AAPS Open.*, 6, 1 (2020).
- 17) Ferrara R., Pilotto S., Peretti U., Caccese M., Kinspergher S., Carbognin L., Karachaliou N., Rosell R., Tortora G., Bria E., Tubulin inhibitors in non-small cell lung cancer: looking back and forward. *Expert Opin. Pharmacother.*, 17, 1113-1129 (2016).
- 18) Kaul R., Risinger A. L., Mooberry S. L., Microtubule-Targeting Drugs: More than Antimitotics. *J. Nat. Prod.*, 82, 680-685 (2019).
- 19) Skwarczynski M., Hayashi Y., Kiso Y., Paclitaxel Prodrugs: Toward Smarter Delivery of Anticancer Agents. *J. Med. Chem.*, 49, 7253-7269 (2006).
- 20) Miele E., Spinelli G. P., Miele E., Tomao F., Tomao S., Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine*, 4, 99-105 (2009).
- 21) Han G., Shi J., Mi L., Li N., Shi H., Li C., Shan B., Yin F., Clinical efficacy and safety of paclitaxel liposomes as first-line chemotherapy in advanced gastric cancer. *Future Oncol.*, 15, 1617-1627 (2019).
- 22) Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A., "Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation," 2nd ed., Informa Healthcare, London, UK, 2011.

- 23) Singh S., Junwal M., Modhe G., Tiwari H., Kurmi M., Parashar N., Sidduri P., Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *Trends Analyt. Chem.*, 49, 71-88 (2013).
- 24) Volk K. J., Hill S. E., Kerns E. H., Lee M. S., Profiling degradants of paclitaxel using liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry substructural techniques. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 696, 99-115 (1997).
- 25) Kumar D., Tomar R. S., Deolia S. K., Mitra M., Mukherjee R., Burman A. C., Isolation and characterization of degradation impurities in docetaxel drug substance and its formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43, 1228-1235 (2007).
- 26) Wang Y., Feng F., Chen L., Zhao H., Tian L., Isolation, identification and characterization of potential impurities in cabazitaxel and their formation. *Magn. Reson. Chem.*, 52, 783-788 (2014).
- 27) Uoto K., Takeda Y., inventor; DAIICHI SANKYO CO., LTD., assignee. WO 2008/117775. 2008 Oct. 2.
- 28) Alsante K. M., Ando A., Brown R., Ensing J., Hatajik T. D., Kong W., Tsuda Y., The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 29-37 (2007).
- 29) Dow L. K., Hansen M. M., Pack B. W., Page T. J., Baertschi S. W., The Assessment of Impurities for Genotoxic Potential and Subsequent Control in Drug Substance and Drug Product. *J. Pharm. Sci.*, 102, 1404-1418 (2013).
- 30) Williams H. J., Scott A. I., Dieden R. A., Swindell C. S., Chirlian L. E., Franel M. M., Heerding J. M., Krauss N. E., NMR and molecular modeling study of the conformations of taxol and of its side chain methylester in aqueous and non-aqueous solution. *Tetrahedron*, 49, 6545-6560 (1993).
- 31) Haasnoot C. A. G., de Leeuw F. A. A. M., Altona C., The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities—I : An empirical generalization of the karplus equation. *Tetrahedron*, 36, 2783-2792 (1980).
- 32) Vasu Dev R., Moses Babu J., Vyas K., Sai Ram P., Ramachandra P., Sekhar N. M., Mohan Reddy D. N., Srinivasa Rao N., Isolation and Characterization of Impurities in Docetaxel.

- J. Pharm. Biomed. Anal., 40, 614-622 (2006).
- 33) Li QC., Cohen K., Tougas T., Qiu F., Li J., McCaffrey J., Purdue T., Song JJ., Abelaira SS., Best Practices for Drug Substance Stress and Stability Studies During Early-Stage Development Part II—Conducting Abbreviated Long-Term and Accelerated Stability Testing on the First Clinical Drug Substance Batch to Confirm and Adjust the Drug Substance Retest Period/Powder for Oral Solution Shelf Life. J.Pharm. Innov. 8, 56-65 (2013).
- 34) Waterman KC., Gerst P., Dai Z., A Generalized Relation for Solid-State Drug Stability as a Function of Excipient Dilution: Temperature-Independent Behavior. J Pharm Sci. 101, 4170-4177 (2012).
- 35) Baertschi SW., Dill AL., Kramer TT., Scrivens G., Suruzhon M., Degradation Rate Observations as a Function of Drug Load in Solid-State Drug Products. J Pharm Sci. 108, 1746-1755 (2019).
- 36) Patterson A., Ferreira AP., Banks E., Skeene K., Clarke G., Nicholson S., Rawlinson-Malone C., Modelling Drug Degradation in a Spray Dried Polymer Dispersion Using a Modified Arrhenius Equation. Int J Pharm. 478, 348-360 (2015).
- 37) Tang C., Sinchuk N., Flavier K., Waterman KC., Waterman A., Krisch MJ., Effect of Oxygen Level and Temperature on Stability of Lipids. Poster presented at: the American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting 2019 PharmSci 360, San Antonio, TX, November 2019.
- 38) Robnik B., Likozar B., Wang B., Stanić Ljubin T., Časar Z., Understanding and Kinetic Modeling of Complex Degradation Pathways in the Solid Dosage Form: The Case of Saxagliptin. Pharmaceutics. 11, 452 (2019).
- 39) Scrivens G., Prediction of the Long-Term Dissolution Performance of an Immediate-Release Tablet Using Accelerated Stability Studies. J Pharm Sci. 108, 506-515 (2019).
- 40) Qiu F., Scrivens G., "Accelerated Predictive Stability (APS): Fundamentals and Pharmaceutical Industry Practices," Academic Press, Cambridge, MA, 2018.
- 41) Narang AS., Desai D., Badawy S., Impact of Excipient Interactions on Solid Dosage Form Stability. Pharm Res. 29, 2660-2683 (2012).
- 42) Mroso PV., Li Wan Po A., Irwin WJ., Solid-state Stability of Aspirin in the Presence of



- Excipients: Kinetic Interpretation, Modeling, and Prediction. *J Pharm Sci.* 71, 1096-1101 (1982).
- 43) Yamamura T., Ohta T., Taira T., Ogawa Y., Sakai Y., Moribe K., Yamamoto K., Effects of Automated External Lubrication on Tablet Properties and the Stability of Eprazinone Hydrochloride. *Int J Pharm.* 370, 1-7 (2009).
- 44) Stanis B., Paszun S., Strzyzicka N., Ptaszyński E., Influence of Humidity and Hydroxypropyl Cellulose, Hydroxypropylmethyl Cellulose, Glyceryl Behenate or Magnesium Stearate on the Degradation Kinetics of Quinapril Hydrochloride in Solid Phase. *Acta Pol Pharm.* 67, 99-102 (2010).
- 45) Stanis B., Regulska K., Kania J., Garbacki P., Effect of pharmaceutical excipients on the stability of angiotensin-converting enzyme inhibitors in their solid dosage formulations. *Drug Dev Ind Pharm.* 39, 51-61 (2013).
- 46) Nie H., Xu W., Ren J., Taylor LS., Marsac PJ., John CT., Byrn SR., Impact of Metallic Stearates on Disproportionation of Hydrochloride Salts of Weak Bases in Solid-State Formulations. *Mol Pharm.* 13, 3541-3552 (2016).
- 47) Patel MA., Luthra S., Shamblin SL., Arora KK., Krzyzaniak JF., Taylor LS., Effect of Excipient Properties, Water Activity, and Water Content on the Disproportionation of a Pharmaceutical Salt. *Int J Pharm.* 546, 226-234 (2018).
- 48) Swaminathan V., Kildsig DO., An Examination of the Moisture Sorption Characteristics of Commercial Magnesium Stearate. *AAPS PharmSciTech.* 2, 73-79 (2001).
- 49) Fu M., Perlman M., Lu Q., Varga C., Pharmaceutical Solid-State Kinetic Stability Investigation by Using Moisture-Modified Arrhenius Equation and JMP Statistical Software. *J Pharm Biomed Anal.* 107, 370-377 (2015).
- 50) Badawy SI., Hussain MA., Microenvironmental pH Modulation in Solid Dosage Forms. *J Pharm Sci.* 96, 948-959 (2007).