

東邦大学審査学位論文（博士）

ステロイドスルファターゼ阻害剤  
KW-2581 の Jet mill 粉碎における  
分解メカニズムに関する研究

2015 年

東邦大学大学院薬学研究科

青木 匡

博 士 論 文

2015 年

東邦大学大学院薬学研究科 青木 匡

指導： 寺田 勝英 教授

## 略 語 表

CID	collision-induced dissociation
COSY	correlation spectroscopy
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	dimethyl sulfoxide
ESI	electrospray ionization
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
LCMS	liquid chromatography mass spectrometry
<i>m</i> -CPBA	<i>m</i> -chloroperbenzoic acid
NMR	nuclear magnetic resonance
PCC	pyridinium chlorochromate
PXRD	powder X-ray diffraction
RRT	relative retention time
SEM	scanning electron microscopy
TMS	tetramethylsilane
UV	ultraviolet
ESR	electron spin resonance

# 目 次

序 論 .....	1
第 1 章 ステロイドスルファターゼ阻害剤 .....	1
第 2 章 ステロイドスルファターゼ阻害剤 KW-2581 の開発 .....	4
本 論 .....	6
第 1 章 KW-2581 の未粉碎品および各種粉碎品における品質および物性の比較 .....	6
第 I 節 各種 KW-2581 の水分、類縁物質、結晶性、粒子径および吸湿性の比較 .....	6
I-1 水分量および類縁物質の測定 .....	6
I-2 粉末 X 線回折を用いた結晶形の確認および結晶化度の測定 .....	8
I-3 SEM を用いた粒子径の測定 .....	9
I-4 吸湿性試験 .....	10
第 II 節 KW-2581 の苛酷試験 .....	11
第 2 章 KW-2581 の Jet mill 粉碎で生成した分解物の構造決定 .....	13
第 I 節 分解物の質量分析および UV 吸収スペクトル .....	13
I-1 質量分析 .....	13
I-2 UV 吸収スペクトル .....	15
第 II 節 KW-2581 の結晶構造解析 .....	17
第 III 節 合成的アプローチによる分解物の構造決定 .....	19
III-1 分解物 D-1 (相対保持時間 0.51) の構造決定 .....	19
III-2 分解物 D-2 (相対保持時間 0.76) の構造決定 .....	20
III-3 分解物 (相対保持時間 0.34–0.48) の構造決定 .....	27
結 論 .....	30
謝 辞 .....	31
実験の部 .....	32
【1】 試薬 .....	32
【2】 測定機器 .....	33
【3】 乳鉢粉碎 .....	34
【4】 粉末 X 線回折による結晶形の確認および結晶化度の測定 .....	34

【5】 SEM を用いた粒子径の評価 .....	34
【6】 吸湿性試験 .....	34
【7】 苛酷試験 .....	35
【8】 類縁物質試験.....	35
【9】 KW-2581 の結晶構造解析 .....	36
【10】 分解物の構造決定.....	36
(1) LC/MS.....	36
(2) LC/UV.....	37
(3) NMR スペクトル .....	37
(4) 分解物 D-1 (RRT = 0.51)の合成 .....	38
(5) 分解物 D-1 (RRT = 0.51)の単離 .....	38
(6) 分解物 D-2 (RRT = 0.76)の合成 .....	38
(7) 分解物 D-2 (RRT = 0.76)の単離 .....	38
(8) 分解物(RRT = 0.34–0.48)の合成 (Fenton 酸化).....	39
付 表 .....	40
付 図 .....	46
引 用 文 献.....	50
関連する研究発表 .....	56

# 序 論

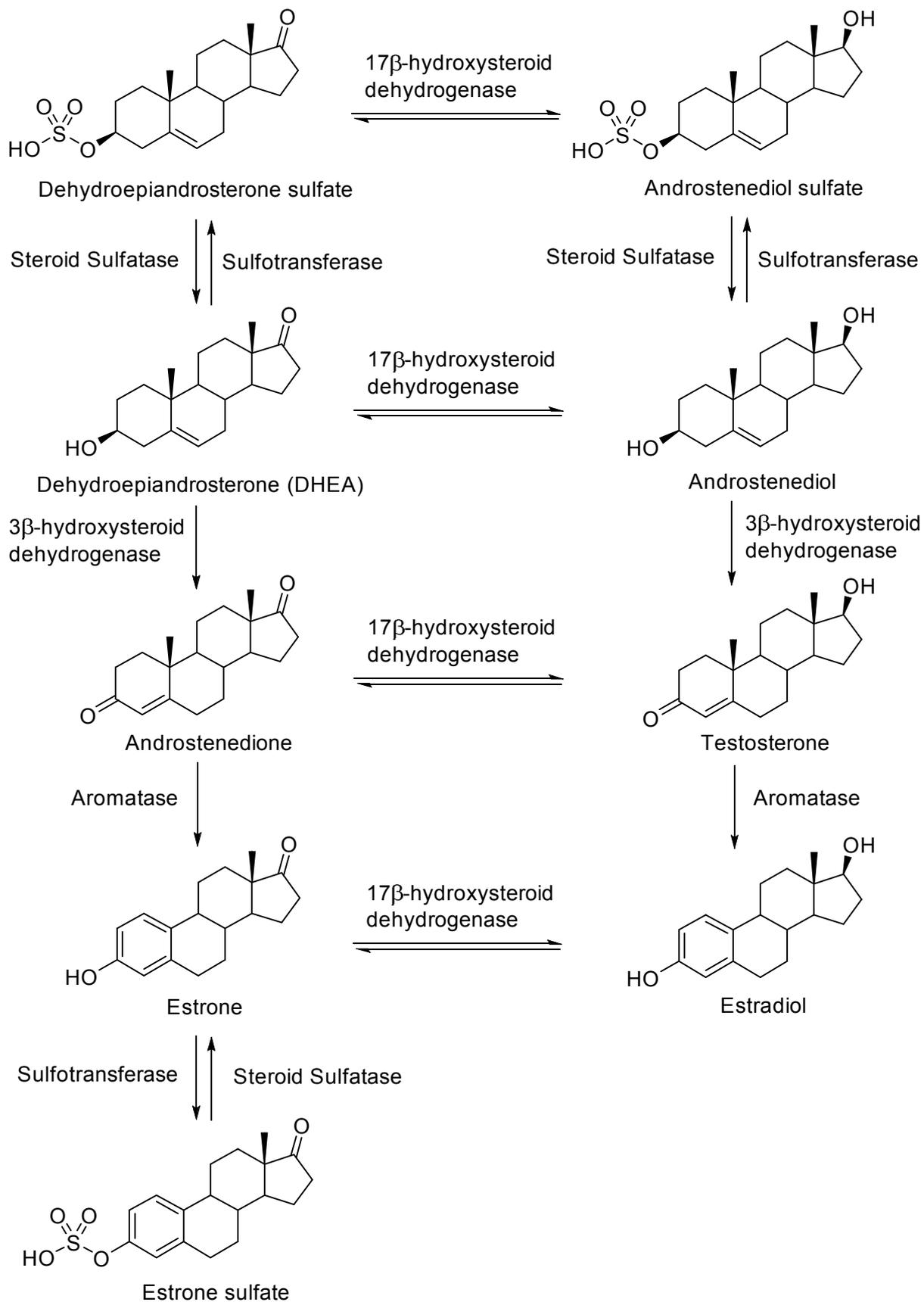
## 第 1 章 ステロイドスルファターゼ阻害剤

Steroid sulfatase (STS: EC 3.6.1.2) 遺伝子は、X連鎖性劣性魚鱗癬 (伴性遺伝性魚鱗癬) の原因遺伝子として知られている<sup>1,2)</sup>。本疾患は約 6000 人に 1 人の割合で発生している劣性遺伝疾患であり、X 染色体上にコードされる STS 遺伝子が欠損、あるいは機能不全を来たすと、細胞間接着に寄与する硫酸コレステロールが角層細胞間に蓄積し、角質細胞が剥離遅延を起こすことで本症を発症する。本疾患は、皮膚が乾燥および粗造化して魚の鱗のように見えることから名づけられており、伴性劣性遺伝のため、基本的に男性にのみ発症する遺伝性角化症である<sup>3,4)</sup>。このように遺伝性疾患の原因遺伝子として同定された STS ではあるが、一方で estrogen に代表される女性ホルモンの生合成<sup>5)</sup> (Fig. 1)においても重要な役割が知られている。

乳がんの重要な臨床知見として、血漿中 estrogen 濃度が高い閉経前ではなく、より低い閉経後において多くの乳がんが発症している点が挙げられる。閉経前後の血漿中 estrogen 濃度は劇的に低下するが<sup>6)</sup>、乳がんは多くの場合発生時期が閉経前とされるものの、estrogen 濃度がより低い閉経期においても estrogen 依存性の増殖をすることが知られている。本現象に対する一つの答えとして、Miller や Sasano らは intracrinology の概念を提唱している<sup>7,8)</sup>。つまり副腎、卵巣などから分泌されたホルモンが標的組織に作用するという古典的な endocrinology に対し、腫瘍局所での estrogen 合成により、血液中の estrogen 濃度に関係なく estrogen 依存性細胞増殖が行われるとする intracrinology が、近年注目されている。本概念を乳がん局所でのホルモン産生に置き換えると、その有力な担い手として挙げられるのが aromatase と STS である。aromatase および STS は、いずれも乳がん局所での発現が報告されており<sup>9-11)</sup>、また血漿中には両酵素の基質である androstenedione (aromatase の基質)および estrone sulfate (STS の基質)が高濃度で存在し、両酵素が乳がん局所での estrogen 合成に重要な役割を担っている事が強く示唆される<sup>12)</sup>。また腫瘍局所での発現および酵素学的な反応を用いた検証により、STS は aromatase に比べて、より強い活性と estrogen 合成への貢献を示唆するというデータも報告されている<sup>12)</sup>。以上より乳がん局所での estrogen 合成における両酵素の関与や、aromatase 阻害剤の臨床での有効性が必ずしも完全ではないことを考慮すると、STS の阻害剤は、estrogen の供給を遮断する新たな治療剤となる可能性を秘めていると期待されており、近年においても様々な誘導体が合成されている<sup>5)</sup>。

STS 阻害剤の開発に関しては、英国 Imperial College of Science の Reed らのグループがこれまで多くの報告を行っており<sup>13)</sup>、特に STS の estrone sulfate 結合部に強固に結合する典型的な競合拮抗型の薬剤として、ステロイド骨格を有する estrone-3-o-

sulfamate (EMATE) (Fig. 2b) <sup>14, 15)</sup>およびクマリン骨格を有する 6-oxo-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyclohepta-[c][1]benzopyran-3-*o*-sulfamate (STX64) (Fig. 2c)が知られている <sup>16)</sup>。EMATE は STS 阻害剤として世界で初めてヒトに投与された化合物として注目されたが、本化合物は強力な **estrogen** 様作用を示すことから、ホルモン依存性腫瘍の治療には適切ではないことが明らかになり <sup>17)</sup>、その後開発中止になっている。**estrogen** 合成阻害剤として開発を目指す以上、その阻害剤に **estrogen** 様作用がある事は一切許されない。一方 STX64 は、**estrogen** 様作用を持たない三環系クマリンのスルファミン酸化合物であり、閉経後乳がんを対象に第一相臨床試験(Phase I)が実施された。その結果、5 日間投与後の末梢血リンパ球 STS 阻害率の平均値は 98%、乳がん組織内 STS 阻害率の平均値は 99%であり、期待通り、**estrone**、**estradiol**、**androstenediol** および **dehydroepiandrosterone (DHEA)**の血清中濃度は、全て投与前に比べて顕著に低下することが確認されている。また本試験は Phase I 試験ではあるが、アロマターゼ阻害剤に無効であった4例が、2.75~7 ヶ月間 **stable disease (SD)**となっており、ホルモン療法剤としての STS 阻害剤の有用性を強く示唆する結果である <sup>18)</sup>。その後 STX64 は、子宮内膜がん、**estrogen** 依存性閉経後転移性乳がんおよび前立腺がんを適応として Phase II 試験が実施されたが、単剤では有効性が十分認められなかったため <sup>19)</sup>、現在他のホルモン療法との併用療法で、ホルモン依存性がんを適応とした開発が行われており、今後の進展が期待されている <sup>20)</sup>。



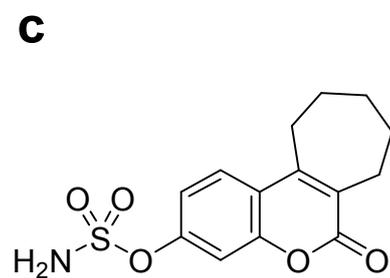
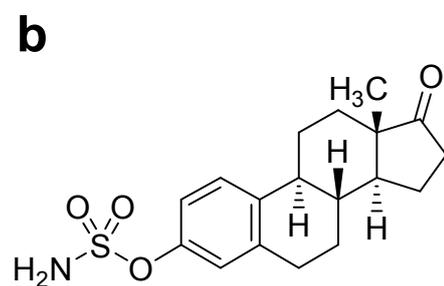
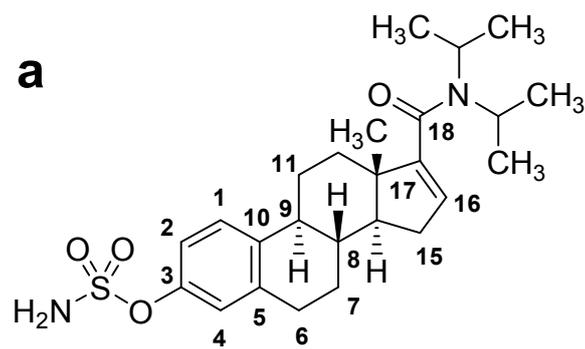
**Figure 1.** Biosynthesis of estrogenic steroids.

## 第 2 章 ステロイドスルファターゼ阻害剤 KW-2581 の開発

第 1 章で述べた背景の下、我々は強力な STS 阻害活性と高い酵素阻害選択性を有する STS 阻害剤の探索研究を進めた結果、*in vitro* および *in vivo* の双方で強い抗腫瘍活性を示し、かつ卵巣摘出ラットの子宮重量増加作用を指標にした estrogen 様活性評価においても陰性である KW-2581 (17-diisopropylcarbamoyl-1,3,5(10),16-estratetraen-3-yl sulfamate) (Fig. 2a)を見出した<sup>21,22</sup>。KW-2581 は STX64 以上に強い STS 阻害活性を示し(Ki 値は STX64 が 40 nM に対し、KW-2581 は 15 nM)、また重篤な副作用を引き起こす恐れのある類似酵素(arylsulfatase A、B)の阻害活性も示さない。このように KW-2581 は、estrogen 生合成酵素の 1 つである STS を阻害することにより estrogen の供給を遮断し、ホルモン依存性腫瘍の増殖を抑制するコンセプトの抗がん剤(ホルモン療法剤)であり、ホルモン依存性乳がん、子宮内膜がん等を対象疾患とする非常に魅力的なステロイド剤であるが、非常に難溶性(水への溶解度：約 0.1 ng/mL)であることから、経口バイオアベイラビリティ向上のために、溶解性改善に向けた検討が必要であると考えられた。

近年難溶性化合物が増加しており、経口バイオアベイラビリティ向上のために塩<sup>23</sup>、co-crystal<sup>24</sup>、準安定晶<sup>25</sup>、ナノ粒子<sup>26</sup>、固体分散体<sup>27</sup>、シクロデキストリン<sup>28</sup>、プロドラッグ<sup>29</sup>、自己乳化型製剤<sup>30</sup>など様々な手法が利用されているが、溶解速度を向上<sup>31,32</sup>させることで吸収性を改善させる粉碎は、製剤における均一性確保の観点および比較的簡便に検討を実施できることから、一般的に幅広く用いられている。しかし粉碎はメカノケミカル効果<sup>33,34</sup>により、化合物の分解<sup>35</sup>、結晶転移<sup>36</sup>、部分的なアモルファス化<sup>37,38</sup>、流動性の変化<sup>39</sup>等を引き起こすことが知られている。海外の粉碎業務受託機関にて、KW-2581 につき Jet mill 粉碎を実施したところ、未粉碎品に比べて品質レベルの低下(水分および類縁物質の増加)が確認された。そこで本 Jet mill 粉碎で観測された品質低下の原因を解明するため、粉碎品および未粉碎品につき、KW-2581 原薬の粉末 X 線回折を用いた結晶形の確認および結晶化度の測定、吸湿性試験(75%RH および 93%RH)および苛酷試験(温度 70°C および湿度 93%RH)を実施した。また、KW-2581 Jet mill 粉碎品の苛酷試験(70°C、1 ヶ月)において観測された主な分解物につき、分光学的および合成化学的手法によりそれらの構造決定を実施した。

本研究では KW-2581 の Jet mill 粉碎品に対する包括的な検討を行うことで、Jet mill 粉碎時に観測された分解物の同定ならびに分解メカニズムの解明を試みた。以下、これらの結果について論述する。



**Figure 2.** Chemical structures of KW-2581 and other steroid sulfatase inhibitors. (a) KW-2581, (b) EMATE, (c) STX64.

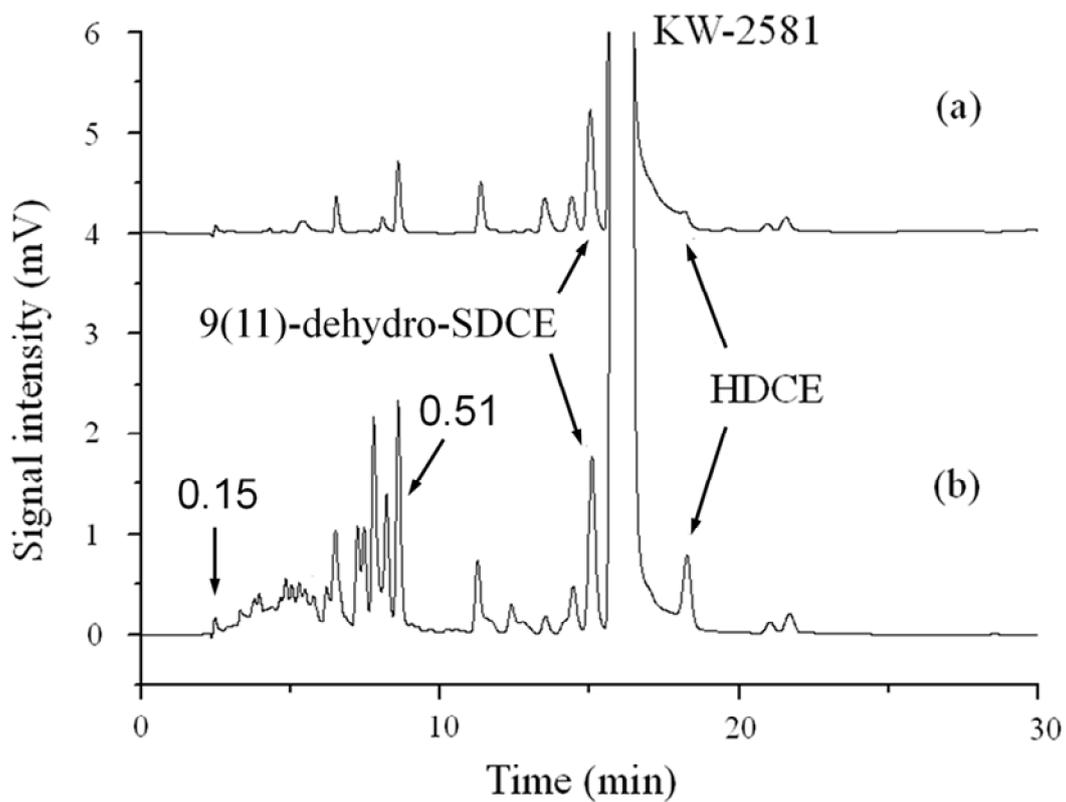
# 本 論

## 第 1 章 KW-2581 の未粉碎品および各種粉碎品における品質および物性の比較

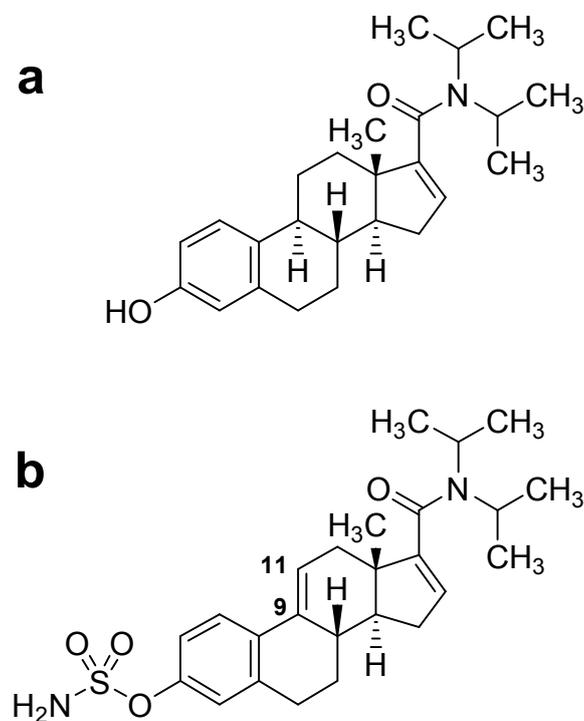
### 第 I 節 各種 KW-2581 の水分、類縁物質、結晶性、粒子径および吸湿性の比較

#### I-1 水分量および類縁物質の測定

粉碎業務受託機関にて Jet mill 粉碎された KW-2581 原薬の異なる 3 ロットにつき、水分および類縁物質の測定を実施した。その結果、水分は 0.53~0.75%であり、全て原薬規格の判定基準である 0.2%を超えていることが確認された。また、類縁物質総量も原薬規格の判定基準( $\leq 1.0\%$ )の範囲内ではあるが、未粉碎品に比べて増加しており、特に Lot 0207M01 での品質低下(水分: 0.03%  $\rightarrow$  0.75%、類縁物質総量: 0.35%  $\rightarrow$  0.75%)が顕著であった。未粉碎品 Lot 0207 および Jet mill 粉碎品 Lot 0207M01 の類縁物質試験における HPLC クロマトグラムを Figure 3 に示す。粉碎により、未粉碎品にも含まれる KW-2581 の加水分解体である HDCE (Fig. 4a)や 9(11)-dehydro-SDCE (Fig. 4b)および保持時間 2.5 分~8.6 分(相対保持時間 0.15~0.51)の化合物群など、多数の分解物の増加が確認された。このように KW-2581 原薬は、一般的にビーズミル等の媒体を用いた粉碎に比べてソフトな粉碎法とされる Jet mill 粉碎において、品質低下することが確認された。



**Figure 3.** Comparison of the HPLC chromatograms of KW-2581 (numbers show relative retention times). (a) intact and (b) jet mill-micronized in related substances test.



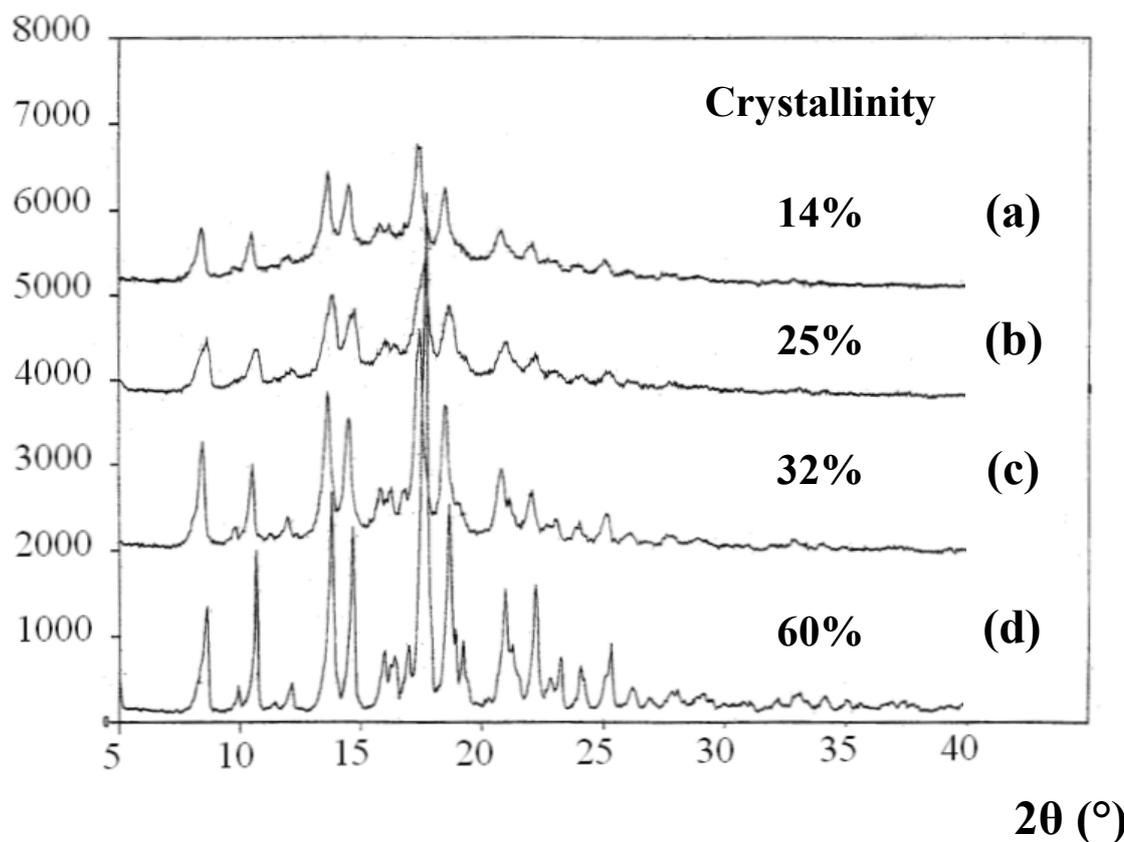
**Figure 4.** Chemical structures of (a) HDCE and (b) 9(11)-dehydro-SDCE.

## I-2 粉末 X 線回折を用いた結晶形の確認および結晶化度の測定

一般的に粉砕などのメカノケミカルなエネルギーにより結晶転移が生じ、物性に变化が生じることが知られている<sup>36)</sup>。そこで KW-2581 原薬で見られた粉砕による品質低下が、結晶形および結晶化度の変化に起因するものかどうかを調べるため、粉末 X 線回折による結晶形の確認および結晶化度の測定を行った。

KW-2581 の未粉砕品、Jet mill 粉砕品、未粉砕品を乳鉢で粉砕したもの、および Jet mill 粉砕品をさらに乳鉢で粉砕したものという粉砕の程度が異なる 4 種類の試料につき、粉末 X 線回折を測定した。粉末 X 線の回折パターンおよび結晶化度の測定結果を Figure 5 に示す。いずれの試料についても同じ  $2\theta$  角にピークが得られたことから、粉砕による結晶形の変化はないことが判明した。しかし結晶化度については、粉砕の程度に応じて顕著に低下していることが確認された。一般的に同一化合物のアモルファスと結晶を比べた場合、アモルファスの方が不安定とされている<sup>40)</sup>。以上より、粉砕品の品質低下は、粉砕工程におけるアモルファス部分の増加と、それに伴う不安定化に起因すると推定された。

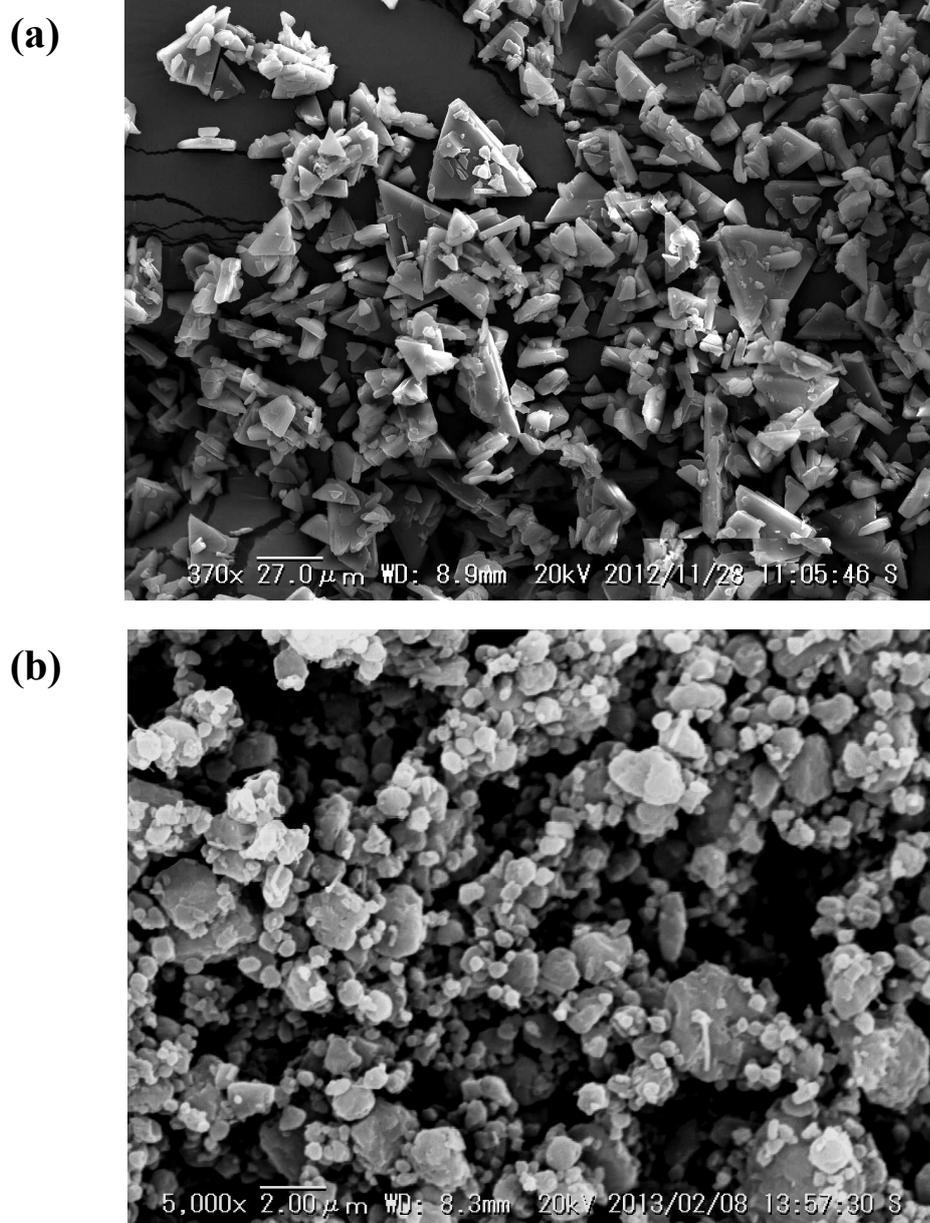
**Intensity  
(counts)**



**Figure 5.** PXRD patterns and crystallinities of KW-2581 following the application of different micronization methods. (a) jet mill micronized followed by mortar and pestle micronized, (b) jet mill micronized, (c) mortar and pestle micronized, and (d) intact.

### I-3 SEM を用いた粒子径の測定

KW-2581 の未粉碎品および Jet mill 粉碎品につき、SEM を用いた粒子径の評価を実施した。結果を Figure 6 に示す。未粉碎品に関しては、少量の 10–20  $\mu\text{m}$  の粒子の存在も認められるが、大多数の粒子が 1–10  $\mu\text{m}$  であることが確認された。一方、Jet mill 粉碎品は、粉碎による粒子径の低下が観測され、Jet mill 粉碎品としては一般的である 1–2  $\mu\text{m}$  の粒子径であることが確認された。一般的に粒子は小さいほど表面積が増大するため、不安定化し易いとされている。しかし今回の未粉碎品と Jet mill 粉碎品の粒子径を比べた場合、確かに差はあるものの、安定性に影響を与えるほど顕著ではないことから、粉碎品の品質低下に関して、粒子径の低下が主要因である可能性は低いと考えられた。



**Figure 6.** Scanning electron microscopic images of KW-2581. (a) intact and (b) jet mill micronized.

#### I-4 吸湿性試験

結晶のアモルファス化による物性変化の一つに吸湿性の増加があることから<sup>41, 42)</sup>、KW-2581 原薬の Jet mill 粉碎品と未粉碎品における吸湿性の違いを調べた。未粉碎品、Jet mill 粉碎品、未粉碎品を乳鉢で粉碎したもの、および Jet mill 粉碎品を減圧乾燥したものにつき、室温下、75%RH および 93%RH の条件で 7 日間の吸湿性試験を実施した。試験結果を Table 1 に示す。KW-2581 原薬は、粉碎の有無に関わらず経時的な質量増加を示さず、吸湿性を持たないことが判明した。このことは、試験開始時および 7 日後におけるカールフィッシャー水分測定において、水分量の増加が観測されなかったことから支持された。Jet mill 粉碎品については、試験開始時の水分量 (0.75%) が、すでに平衡に達しているとも考えられたが、それを減圧乾燥したものについても水分の増加が認められないことから、Jet mill 粉碎品には本質的に吸湿性がないことが明らかになった。以上より、Jet mill 粉碎品において観測された未粉碎品からの水分増加は、保存中に吸湿したのではなく、粉碎工程において特異的に吸湿したものと考えられた。また本推定は、粉碎工程を 3 回繰り返した原薬では、粉碎 1 回の原薬(水分量：約 0.4%)に比べて水分量が多いことから支持された。

**Table 1.** Hygroscopicity of KW-2581 under different states of micronization

Micronization method	Humidity (%) <sup>a</sup>	Weight change (%)			Water content (%) <sup>b</sup>	
		Storage period (days)			Initial	7
		1	3	7		
Unmilled	75	-0.03	0.00	-0.01	0.03	0.07
	93	-0.02	0.02	0.00	0.03	0.08
Mortar and pestle	75	0.16	0.08	0.08	0.09	0.14
	93	0.03	0.03	0.03	0.09	0.14
Jet mill	75	0.00	-0.01	0.03	0.75	0.63
	93	-0.01	0.01	0.15	0.75	0.70
Jet mill followed by drying	75	0.02	0.02	0.00	0.09	0.14
	93	0.07	0.08	0.07	0.09	0.13

<sup>a</sup> Relative humidity at room temperature.

<sup>b</sup> Determined by Karl Fischer coulometric titration.

## 第II節 KW-2581 の苛酷試験

KW-2581 原薬粉碎品の不安定化の要因は、粉碎工程における結晶のアモルファス化と水分の増加にあると考えられた。そこで吸湿性試験で用いた粉碎状態の異なる4種類の試料について、湿度(25°C、93%RH)および温度(70°C)を調節した条件で苛酷試験を実施した。結果をそれぞれ Table 2 および Table 3 に示す。湿度を上げた条件(25°C、93%RH)では、いずれの試料も7日目まで安定であることが確認された。一方温度を上げた条件(70°C)では、いずれの試料においても分解物の増加が確認され、特に水分量の最も多い Jet mill 粉碎品での増加(0.68%→3.60%)が顕著であった。試験開始時と苛酷試験1ヵ月目における HPLC クロマトグラムを Figure 7 に示す。主な分解物は、相対保持時間 0.34–0.51 の化合物群と、0.94 (9(11)-dehydro-SDCE)および 1.18 (HDCE)の化合物であり、粉碎後に観測されたこれらの分解物がさらに増加していることが確認された。以上より KW-2581 Jet mill 粉碎品の過酷試験(70°C)における分解メカニズムは、Jet mill 粉碎工程における KW-2581 の分解メカニズムと同様であると推定された。また、減圧乾燥品においては分解物の生成が抑えられていることから、水分の存在が粉碎品を不安定化する要因の一つであると推定された。

**Table 2.** Stress test results for KW-2581 under different states of micronization at 93% RH

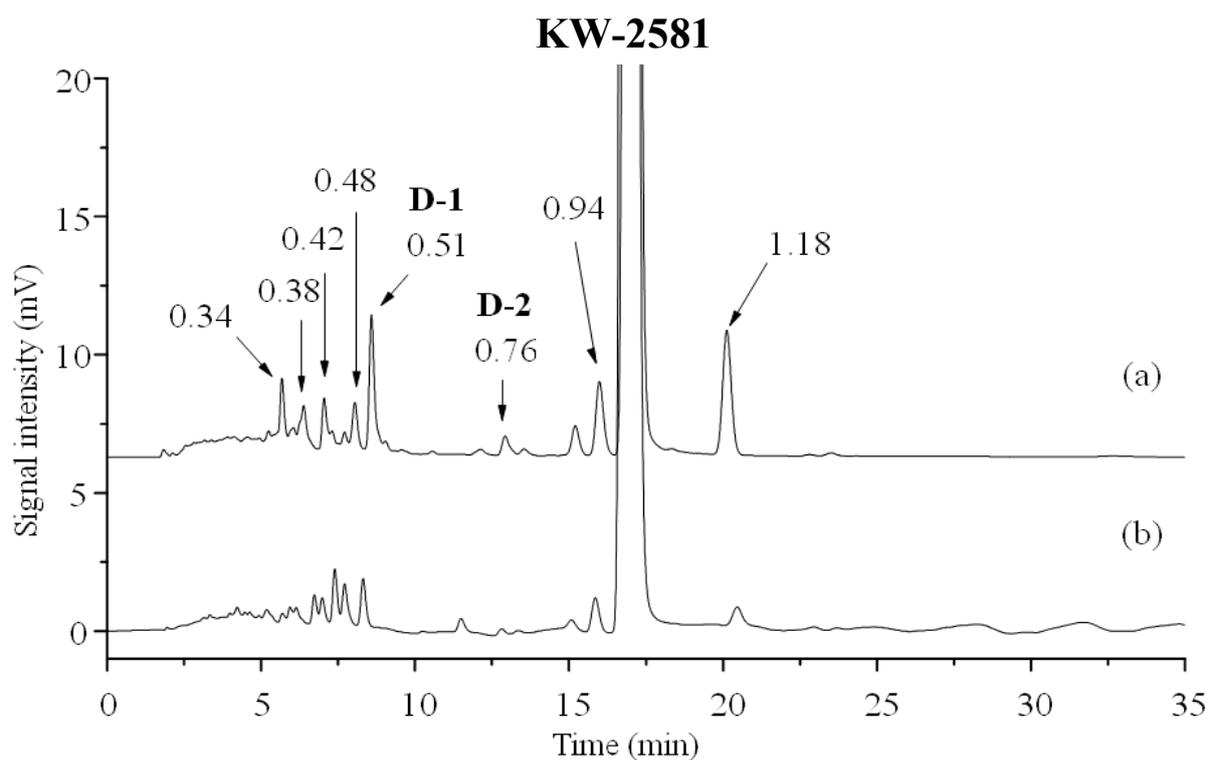
Micronization method	Water content (%) <sup>a</sup>	Total related substances (%)			
		Initial	3 days	7 days	1 month
Unmilled	0.03	0.22	0.20	0.20	—
Mortar and pestle	0.09	0.29	0.24	0.23	—
Jet mill	0.75	0.68	0.68	0.75	—
Jet mill followed by drying	0.09	0.64	0.59	0.60	—

<sup>a</sup> Determined by Karl Fischer coulometric titration.

**Table 3.** Stress test results for KW-2581 under different states of micronization at 70°C

Micronization method	Water content (%) <sup>a</sup>	Total related substances (%)			
		Initial	3 days	7 days	1 month
Unmilled	0.03	0.22	0.20	0.19	0.40
Mortar and pestle	0.09	0.29	0.25	0.28	0.70
Jet mill	0.75	0.68	1.19	1.40	3.60
Jet mill followed by drying	0.09	0.64	0.60	0.63	1.10

<sup>a</sup> Determined by Karl Fischer coulometric titration.



**Figure 7.** HPLC chromatograms of jet mill-micronized KW-2581 stored at 70°C (numbers show relative retention times). (a) after 1 month and (b) before storage.

## 第 2 章 KW-2581 の Jet mill 粉碎で生成した分解物の構造決定

KW-2581 の分解経路を明らかにする目的で、最も分解が顕著であった Jet mill 粉碎品の苛酷試験条件(70°C) 1 ヶ月保存の試料を用いて、分解物の構造決定を実施した。

### 第 I 節 分解物の質量分析および UV 吸収スペクトル

#### I-1 質量分析

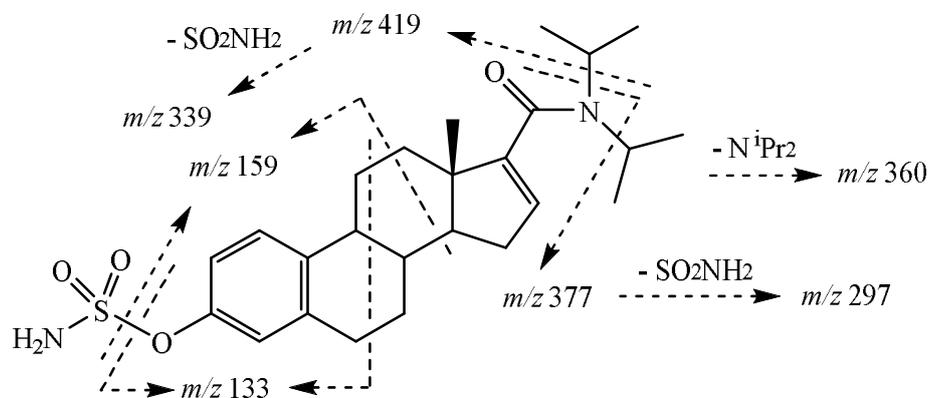
KW-2581 Jet mill 粉碎品の苛酷試験条件(70°C) 1 ヶ月保存の試料中に観測された主な分解物について、エレクトロスプレーイオン化法(ESI 法)により LC/MS 分析を実施した。一般的に ESI 法はソフトなイオン化法であり、プロトン付加分子は検出されやすい一方、フラグメントイオンは検出されにくいことから、構造解析のためのフラグメント情報は、インソース衝突誘起解離(in-source CID)<sup>43)</sup>により取得した。また、主な分解物の交換性プロトンの数を調べるため、重水を用いた水素重水素交換質量分析についても実施した。各分解物における交換性プロトンの数は、プロトン付加分子と重プロトン付加分子との質量差から算出した。各分解物のプロトン付加分子[M+H]<sup>+</sup>の  $m/z$  値、KW-2581 に対する質量差、主なフラグメントイオンおよび交換性プロトンの数を Table 4 に示す。

KW-2581 とその類縁化合物の MS スペクトルにおいては、in-source CID により、イソプロペニル基(CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>3</sub>: 42)、スルファモイル基(SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>: 80)、ジイソプロピルアミノ基(*i*-Pr<sub>2</sub>NH: 101)およびジイソプロピルアミド基(*i*-Pr<sub>2</sub>NCHO: 129)等が脱離したフラグメントイオンが特徴的に観測される(Fig. 8)。これらのフラグメントイオンの解析および交換性プロトンの数より、各分解物の構造推定を行った。保持時間 5.7 分~8.1 分(相対保持時間 0.34–0.48)の分解物のうち KW-2581 に比べて質量数が 16 u または 32 u 大きい化合物は、交換性プロトンの数が KW-2581 の 2 に対して 1 つ多い 3 であることから、KW-2581 のヒドロキシ誘導体またはヒドロキシ誘導体がさらにエポキシ化された誘導体であると推定された。保持時間 8.6 分(相対保持時間 0.51)の分解物(D-1)は、KW-2581 に比べて質量数が 14 u 大きく、交換性プロトンの数は KW-2581 と同じ 2 であることから、KW-2581 のオキソ誘導体と推定された。また保持時間 12.9 分(相対保持時間 0.76)の分解物(D-2)は、KW-2581 に比べて質量数が 16 u 大きく、交換性プロトンの数は KW-2581 と同じ 2 であることから、KW-2581 のエポキシド誘導体と推定された。保持時間 16.0 分(相対保持時間 0.94)および保持時間 20.1 分(相対保持時間 1.18)の分解物は、類縁物質標準品との比較により、それぞれ KW-2581 の 9, 11-デヒドロ誘導体である 9(11)-dehydro-SDCE (Fig. 4b)および KW-2581 の加水分解体である HDCE (Fig. 4a)と同定された。

**Table 4.** Test results of ESI-LC/MS analyses for the jet mill-micronized KW-2581 stored at 70°C for 1 month

Retention time of degradation products (min)	RRT <sup>a</sup>	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Mass difference with KW-2581	Major fragment ions (m/z)	Number of exchangeable protons
5.7	0.34	493	+32	451, 392, 364, 236	3
6.4	0.38	493, 477, 459	+32, +16, -2	417, 337, 236	3, 3, 2
7.1	0.42	493, 477, 459	+32, +16, -2	417, 337, 236	3, 3, 2
8.1	0.48	493	+32	475, 433, 432, 353, 236	3
8.6	0.51	475	+14	433, 414, 391, 353, 236	2
12.9	0.76	477	+16	459, 330, 292, 251, 236	2
16.0 <sup>b</sup>	0.94	459	-2	417, 398, 358, 337, 236	2
17.0 <sup>c</sup>	1	461	—	419, 400, 377, 360, 339, 236	2
20.1 <sup>d</sup>	1.18	382	-79	340, 321, 298	1

<sup>a</sup> Relative Retention Time, <sup>b</sup> 9(11)-dehydro-SDCE, <sup>c</sup> KW-2581, <sup>d</sup> HDCE.



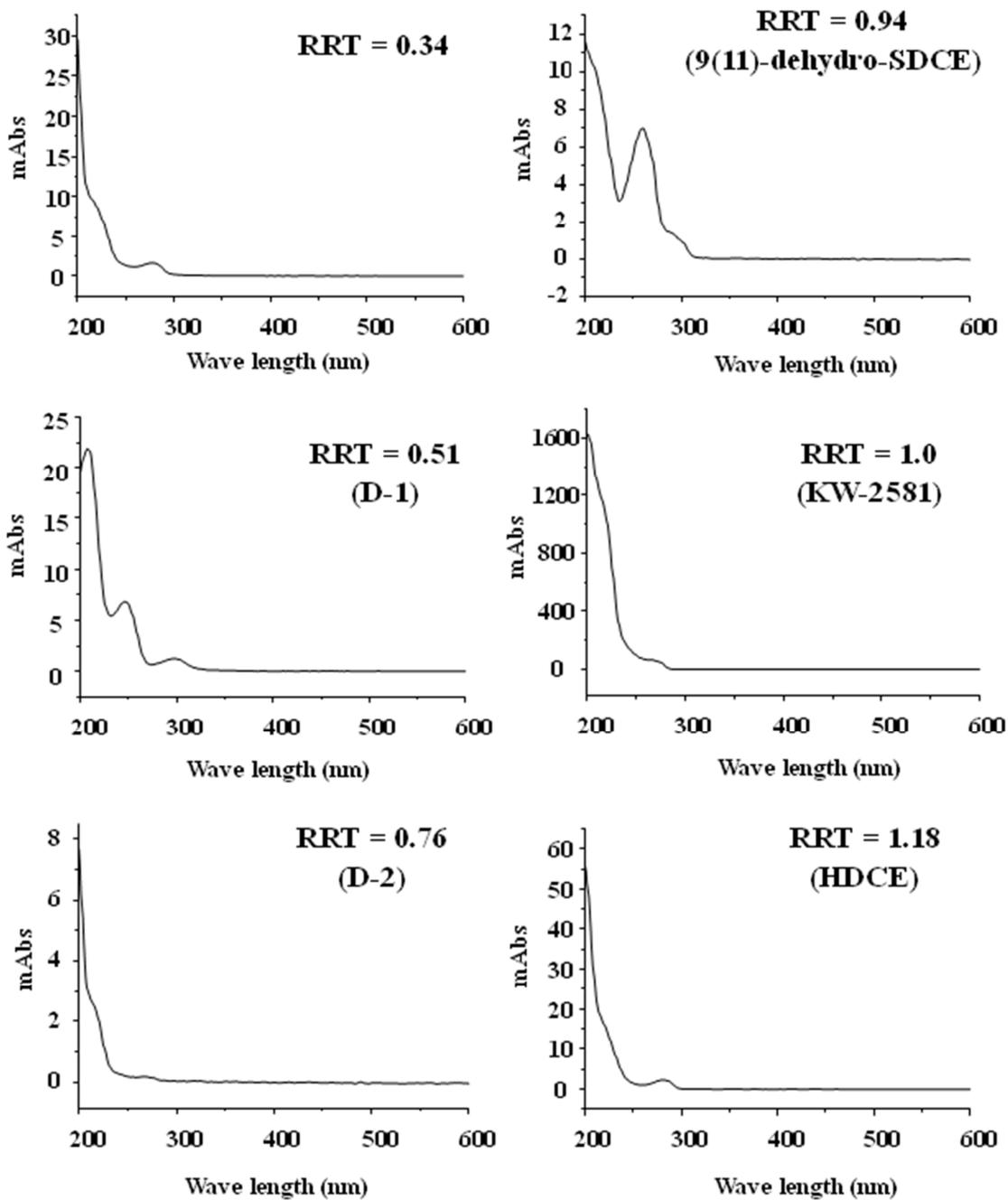
**Figure 8.** Mass fragmentation pattern of KW-2581 (ESI positive mode).

## I-2 UV 吸収スペクトル

KW-2581 Jet mill 粉碎品の苛酷試験条件(70°C) 1 ヶ月保存試料中に観測された主な分解物について、ダイオードアレイ検出器を用いてそれぞれの UV 吸収スペクトルを測定した。得られた各分解物の UV 吸収スペクトルを Figure 9 に示す。保持時間 5.7 分~8.1 分(相対保持時間 0.34~0.48)の分解物は、KW-2581 と類似の UV 吸収スペクトルを示すことから、これらの化合物は、KW-2581 と類似の発色団を有すると推定された。UV スペクトルにおいて、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移から生じる K 吸収帯の存在は、共役  $\pi$  電子系の存在を示唆している。しかし相対保持時間 0.34~0.48 の分解物の UV スペクトルにおいては、スチレン系(244 nm)または共役ジエン系(トランソイドとして約 230 nm、シソイドとして約 270 nm)に特徴的な K 吸収帯は観測されなかった。以上より、KW-2581 に比べて質量数が 16 または 32 u 大きい相対保持時間 0.34~0.48 の分解物の推定化学構造(ヒドロキシ誘導体またはヒドロキシ誘導体がさらにエポキシ化された誘導体)は、UV スペクトルの結果と矛盾がないことが確認された。KW-2581 に比べて質量数が 2 u 小さい相対保持時間 0.34~0.48 の分解物は、その UV 吸収スペクトルにおいてスチレン系または共役ジエン系に特徴的な K 吸収帯が観測されておらず、脱水素化された部位は限定されることから、7 位または 11 位デヒドロ体と推定された。しかし、この領域には複数化合物のスペクトルが重なっており、微量成分のスペクトルがマスクされている可能性もあるため、二重結合の位置については断定できない。

分解物 D-1(相対保持時間 0.51)は、UV スペクトルにおいて 250 および 300 nm 付近に特徴的な吸収を示すことから、分子内に共役系を持つことが示唆された。D-1 は、質量数が KW-2581 に比べて 14 u 大きいことから、スチレンまたはジエン誘導体の一水酸化体である可能性があるが、スルファモイル基以外に交換性プロトンを持たないことから、KW-2581 の 6 位オキソ誘導体と推定された。

分解物 D-2 (相対保持時間 0.76)は、KW-2581 と同様の UV スペクトルを示し、質量数は KW-2581 に比べて 16 u 大きいこと、およびスルファモイル基以外に交換性プロトンを持たないことから、KW-2581 の 16、17 位エポキシド誘導体と推定された。D-2 が KW-2581 と類似した UV スペクトルを示すのは、KW-2581 の立体構造に起因すると思われる。UV スペクトルにおいて、KW-2581 の  $\alpha$ 、 $\beta$  不飽和アミドの K 吸収帯はもともと明瞭ではないが、これはかさ高いジイソプロピルアミド基と 16 位ビニルプロトンとの立体反発により、エノン部分の共平面性が崩れているためと考えられた。そこで KW-2581 の立体構造を確認するため、KW-2581 につき結晶構造解析を実施した。

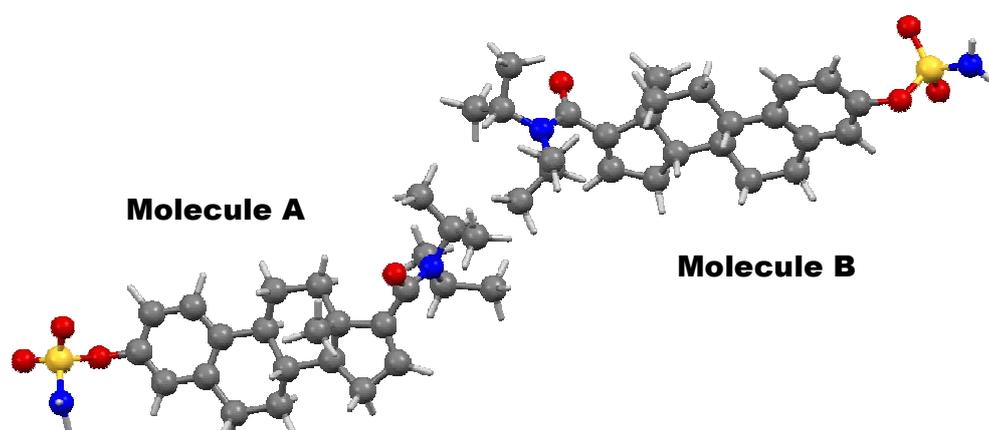


**Figure 9.** UV spectra of KW-2581 and its degradation products.

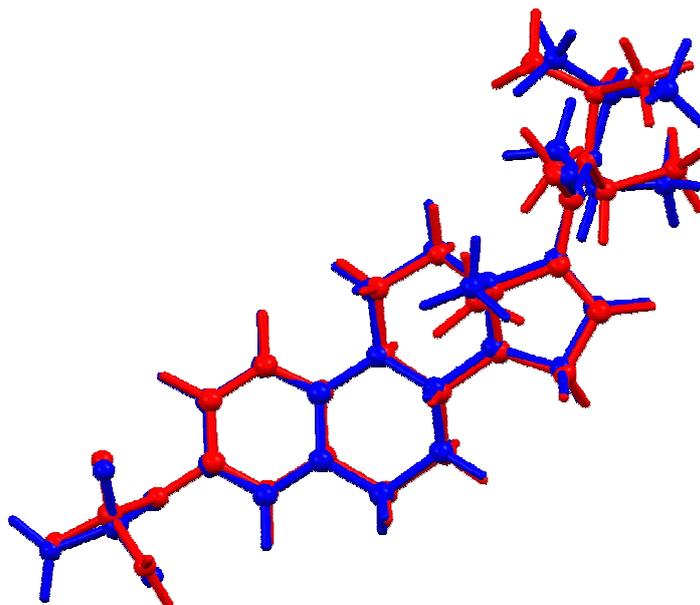
## 第II節 KW-2581 の結晶構造解析

KW-2581 未粉碎品は結晶性の粉末として得られるが、単結晶構造解析に供することができる大きさの結晶は得られていないため、粉末 X 線回折法による結晶構造解析を実施した。大型放射光施設 SPring-8 の産業利用ビームライン I (BL19B2)で測定した生データを用いて実空間法により初期構造を決定した後、リートベルト法により構造精密化を行って最終構造を得た。結晶データと解析の詳細を付表の部の Table A1、非水素原子のナンバリングを付図の部の Figure A1、結晶内分子構造を Figure 10、生データと構造精密化後の結晶構造から算出した粉末回折パターンの重ね合わせを付図の部の Figure A2 に示す。

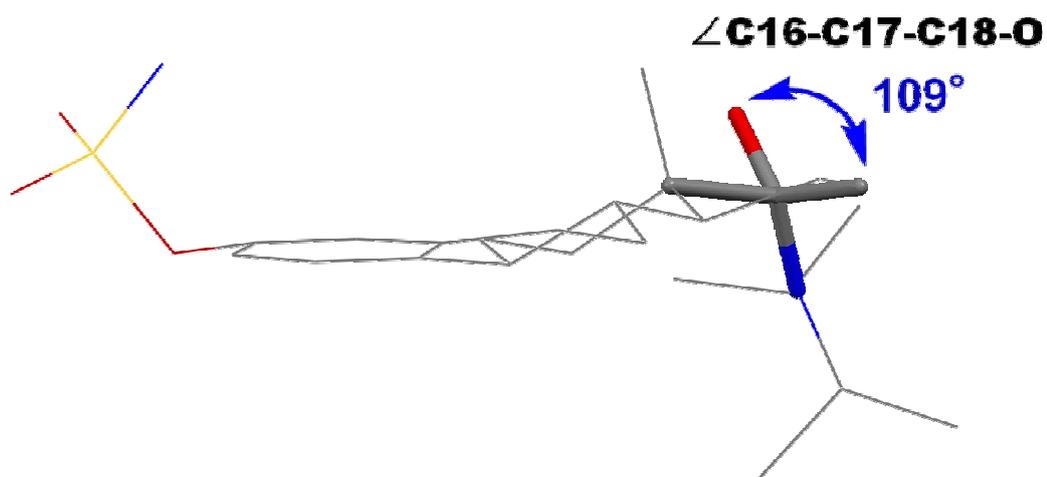
結晶の単位胞の体積と KW-2581 の組成から、単位胞中の KW-2581 分子の数 (Table A1 の  $Z$ ) は四個であると予想された。一方、単位胞の格子定数と消滅則から予想された空間群  $P2_1$  の対称操作の数は二個であり、結晶学的に独立な KW-2581 分子の数 ( $Z$ ) は二個と判断した。以上の知見に基づき、KW-2581 分子二個を検索モデルとしてシミュレーテッドアニーリング (SA) 計算を行ったところ、空隙や非結合原子間の衝突のない化学的に妥当な構造 (Figure 10) を得ることができた。結晶学的に独立な二個の KW-2581 分子の重ね合わせを Figure 11、分子構造上重要な二面角のリストを付表の部の Table A2 に示す。両分子の配座は、スルファミン酸エステル部位が  $120^\circ$  異なる以外はよく似ており、 $N,N$ -二置換アミド部分 (C17/O4-C18-N2-C20/C23) は平面性が保たれていた ( $\angle$ C17-C18-N2-C20 は分子 A が  $176^\circ$ 、分子 B が  $-179^\circ$ )。一方、UV スペクトルから予測された通り、エノン部分 (C16-C17-C18-O4) は、C17-C18 の結合は大きくねじれており ( $\angle$  C16-C17-C18-O4 は分子 A が  $-109^\circ$ 、分子 B が  $-101^\circ$ 、Figure 12)、共平面性は崩れていることが確認された。水素原子のナンバリングを付図の部の Figure A3、KW-2581 の原子座標を付表の部の Table A3 に示す。



**Figure 10.** Molecular structure of KW-2581 in the crystalline powder. Carbon (black), nitrogen (blue), oxygen (red) and sulfur (yellow) atoms are drawn as spheres. Hydrogen (white) atoms are shown as sticks.



**Figure 11.** Superposition of molecules A (red) and B (blue) of KW-2581. Non-hydrogen and hydrogen atoms are shown in spheres and sticks, respectively.



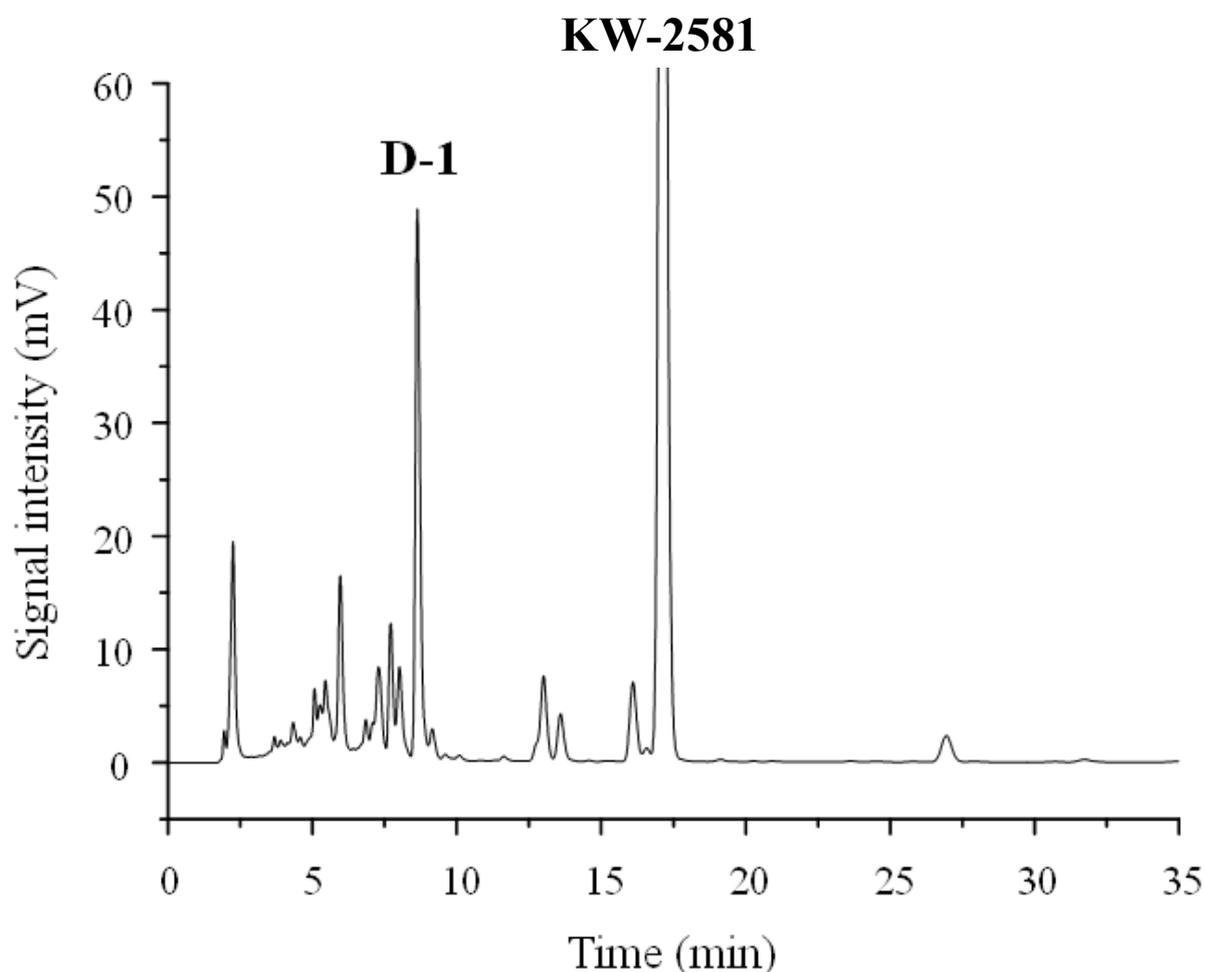
**Figure 12.** Molecules A of KW-2581 viewed along C17–C18 bond. Hydrogen atoms are omitted for clarity.

### 第Ⅲ節 合成的アプローチによる分解物の構造決定

次に KW-2581 に対して各種選択的な酸化反応を実施し、得られた合成化合物と Jet mill 粉碎品の苛酷条件(70℃) 1 ヶ月保存の試料で観測された分解物を比較することで、分解物の構造決定を試みた。

#### Ⅲ-1 分解物 D-1 (相対保持時間 0.51)の構造決定

MS および UV スペクトルの解析から、分解物 D-1 は KW-2581 の 6 位オキソ誘導体と推定された。そこで本推定を確認するため、PCC<sup>44)</sup>を用いた KW-2581 のベンジル位選択的な酸化<sup>45)</sup>で得られた化合物と D-1 との構造比較を実施した。KW-2581 の PCC 酸化で得られた反応液の HPLC クロマトグラムを Figure 13 に示す。多数の生成物が確認されたが、相対保持時間 0.51 の化合物が主として生成することが確認された。



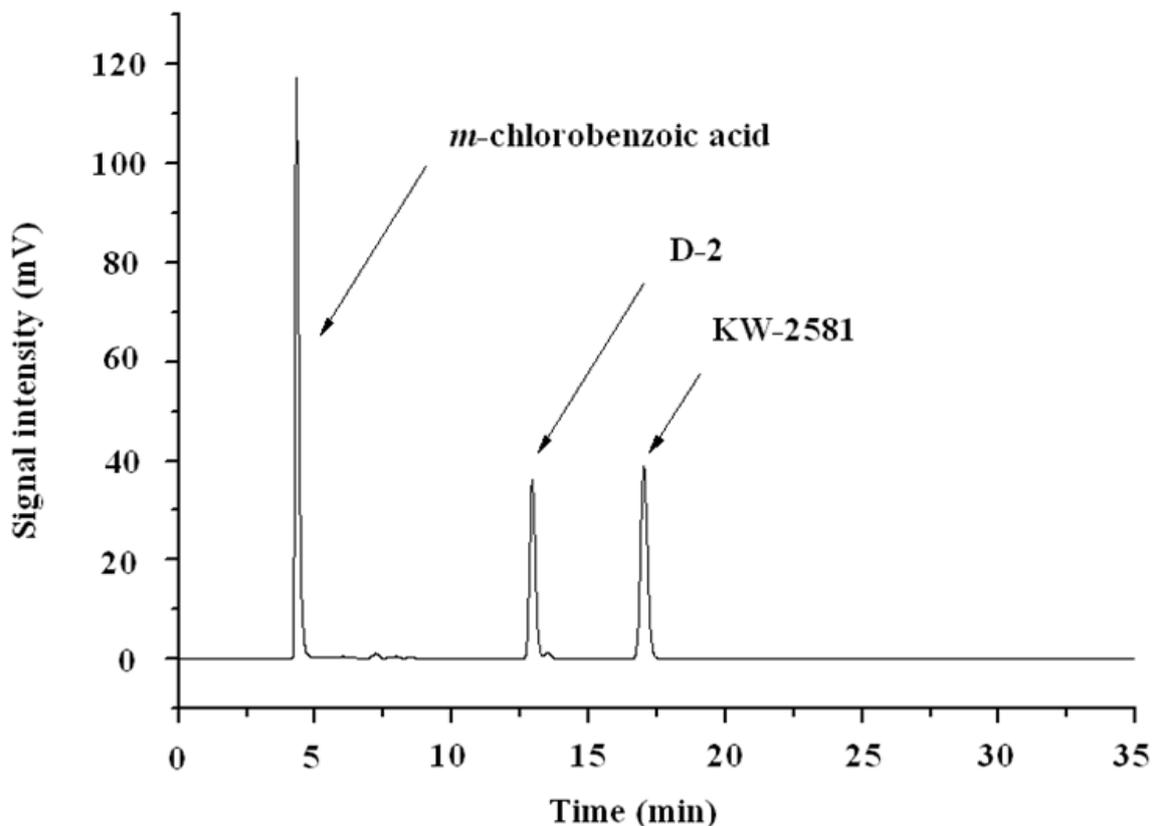
**Figure 13.** HPLC chromatogram of the reaction mixture for the PCC oxidation of KW-2581 after 24 hr.

そこで主生成物である相対保持時間 0.51 の化合物について、LC/MS および LC/UV の測定を行った。MS スペクトルでは、 $m/z$  475 にプロトン付加分子 $[M+H]^+$ が観測されたことから、その質量数は KW-2581 のオキソ誘導体に相当する 474 であることが確認された。また、本化合物の UV スペクトルは、D-1 のスペクトルパターンと一致した。以上のことから、KW-2581 の PCC 酸化で得られた相対保持時間 0.51 の化合物と D-1 は、同一化合物であることが確認された。

そこで D-1 の化学構造を決定するため、KW-2581 の PCC 酸化により得られた相対保持時間 0.51 の化合物を単離し、NMR スペクトルによる構造解析を行った。得られた本化合物の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR データを、それぞれ Table 5 および Table 6 に示す。NMR スペクトルにおける各シグナルの帰属は、KW-2581 の帰属を参考に、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  の 1D および 2D NMR の測定結果に基づいて実施した。結果、KW-2581 と比較して、D-1 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルでは、6 位のメチレンプロトンが消失するとともに、7 位ジェミナルプロトン ( $\delta 2.51$  および  $\delta 2.64$  ppm) および芳香環の 2 位プロトン ( $\delta 7.48$  ppm) および 4 位プロトン ( $\delta 7.76$  ppm) が大きく低磁場シフトして観測された。本結果より、6 位における電子吸引性のカルボニル基の存在が示唆された。 $^{13}\text{C}$  NMR においても 1 個のメチレン炭素のシグナルが消失し、新たに 1 個の共役カルボニル炭素に相当するシグナル ( $\delta 196.5$  ppm) が観測された。また、カルボニル基に対してオルト位の 10 位炭素 ( $\delta 145.5$  ppm) およびパラ位の 2 位炭素 ( $\delta 127.7$  ppm) において、カルボニル基の置換基効果による低磁場シフトが観測された。一方興味深いことに、カルボニル基に対してオルト位の 4 位炭素 ( $\delta 119.7$  ppm) では、予想された低磁場シフトが観測されなかった。これはペリ位に位置する 4 位プロトンと 6 位カルボニル酸素との立体圧縮効果<sup>46)</sup>による高磁場シフトにより、低磁場シフトが相殺されたためと考えられた。その他、6 位カルボニル基の影響の及ばない部位については、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR とともに KW-2581 とほぼ同様のケミカルシフトを示すことが確認された。以上の結果より、分解物 D-1 は KW-2581 の 6 位オキソ誘導体であると決定された (Fig. 18a)。

### III-2 分解物 D-2 (相対保持時間 0.76) の構造決定

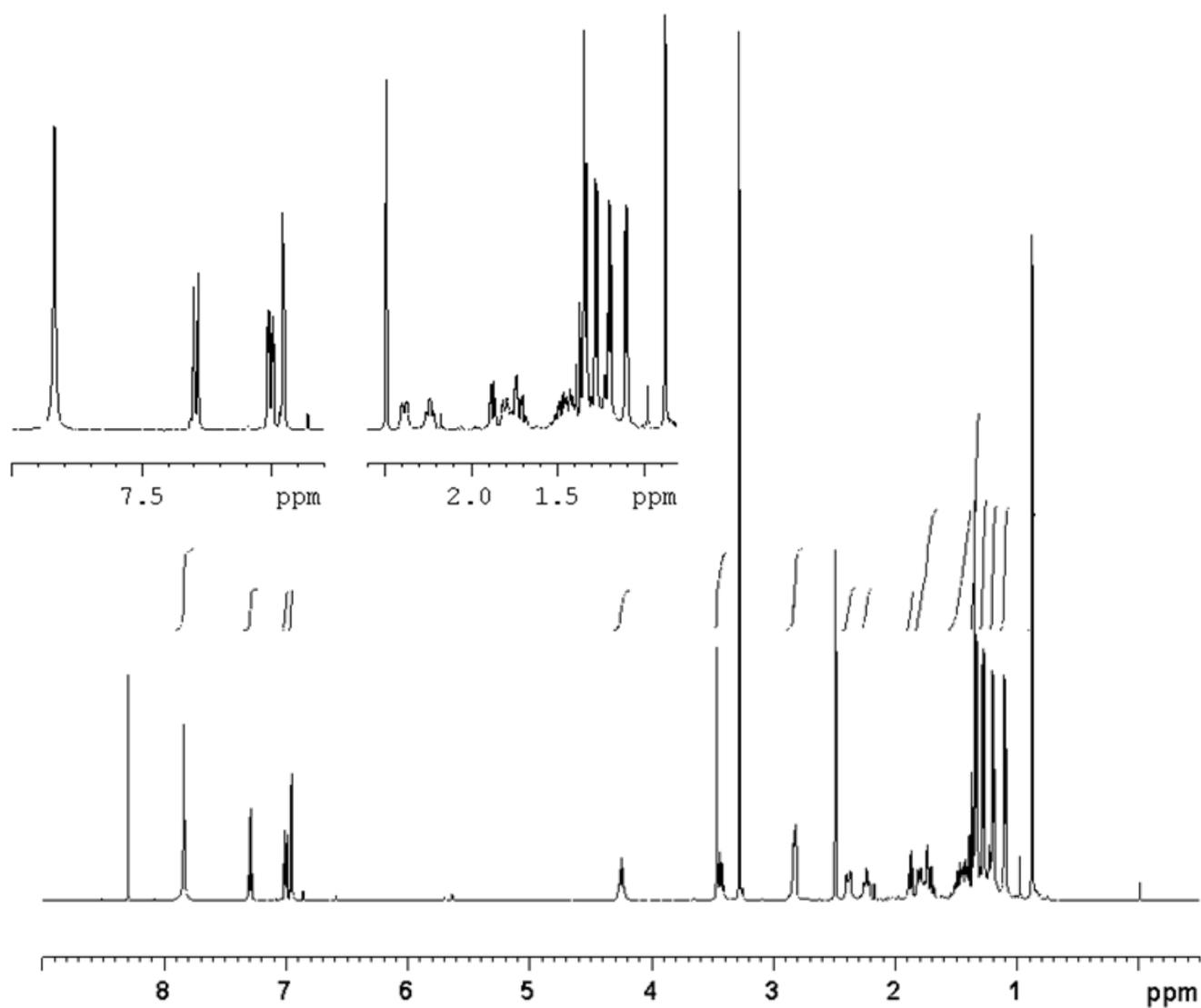
MS および UV スペクトルの解析から、分解物 D-2 は KW-2581 の 16、17 位エポキシド誘導体と推定された。そこで本推定を確認するため、*m*-CPBA を用いた KW-2581 の 16、17 位オレフィン部位の選択的な酸化<sup>47)</sup>で得られた化合物と D-2 との構造比較を実施した。KW-2581 の *m*-CPBA 酸化で得られた反応液の HPLC クロマトグラムを Figure 14 に示す。相対保持時間 0.76 の化合物が、主として生成することが確認された。



**Figure 14.** HPLC chromatogram of the *m*-CPBA mediated oxidation of KW-2581 after 17 hr.

そこで主生成物である相対保持時間 0.76 の化合物について、LC/MS の測定を行った。MS スペクトルでは、 $m/z$  477 にプロトン付加分子 $[M+H]^+$ が観測されたことから、その質量数は KW-2581 の 16, 17 位エポキシド誘導体に相当する 476 であることが確認された。以上より、KW-2581 の *m*-CPBA 酸化で得られた相対保持時間 0.76 の化合物と D-2 は、同一化合物であることが確認された。

そこで D-2 の化学構造を決定するため、KW-2581 の *m*-CPBA 酸化により得られた相対保持時間 0.76 の化合物を単離し、NMR スペクトルによる構造解析を行った。得られた本化合物の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを Figure 15 および Figure 16 に、全ての水素および炭素の帰属をそれぞれ Table 5 および Table 6 に示す。NMR スペクトルにおける各シグナルの帰属は、KW-2581 の帰属を参考に、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  の 1D および 2D NMR の測定結果に基づいて実施した。



**Figure 15.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of D-2 [500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 30  $^\circ\text{C}$ ].  
(Magnifications of  $^1\text{H}$  NMR spectrum in 0.8–2.6 ppm and 6.8–8.0 ppm are shown in upper left.)

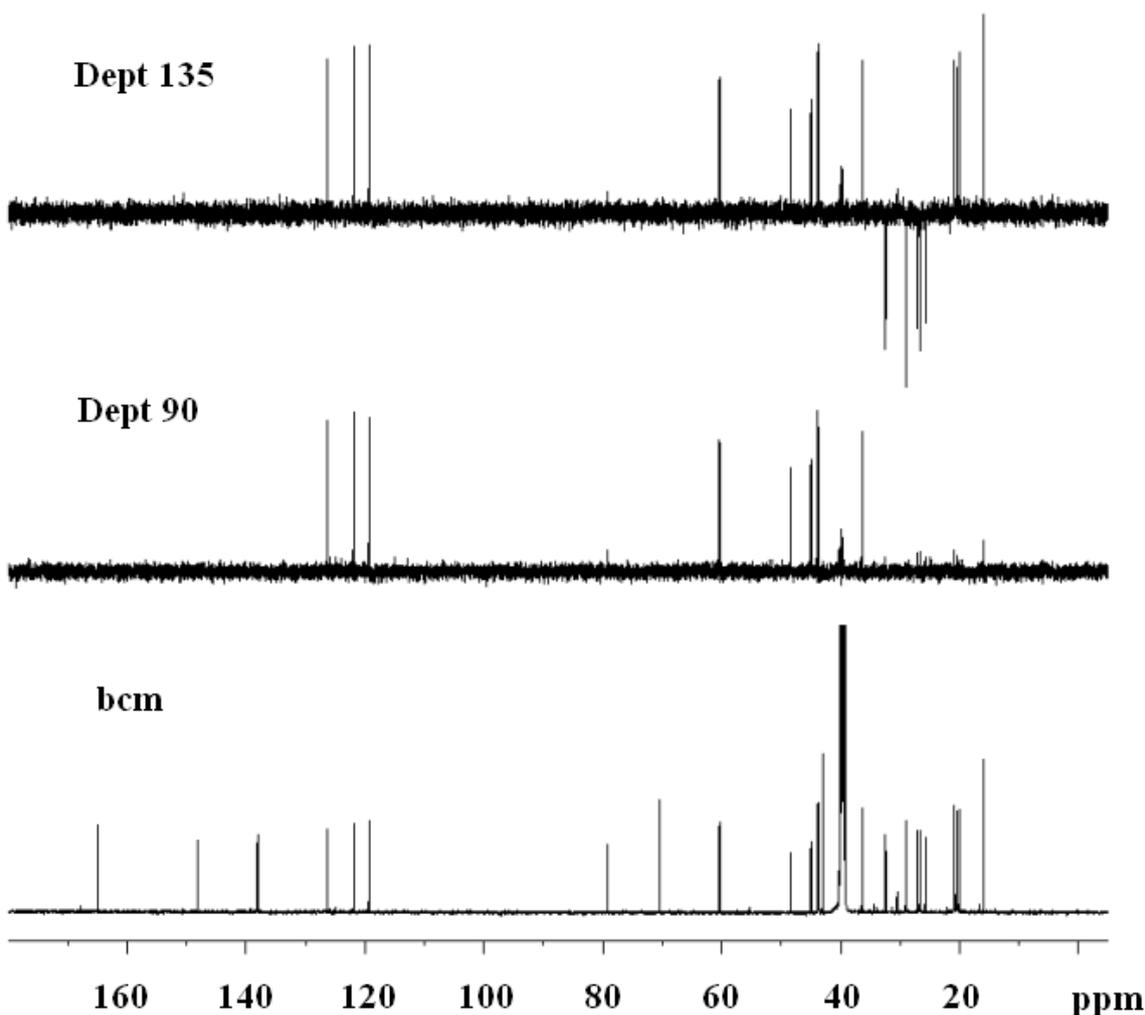


Figure 16.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of D-2 [125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ].

D-2 が KW-2581 の 16、17 位エポキシド誘導体であれば、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて、KW-2581 で  $\delta 5.64$  ppm に観測された 16 位オレフィンプロトンおよび 16 位に隣接する 15 位プロトン ( $\delta 2.06$  および  $\delta 2.3$  ppm) が高磁場にシフトすると考えられた。実際、D-2 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいては、16 位プロトンが  $\delta 3.47$  ppm へ、15 位プロトンが  $\delta 1.4$  および  $\delta 1.88$  ppm へ、それぞれ高磁場へのシフトが観測された。また、ジイソプロピルアミノ基の 4 個のメチル基に関して、KW-2581 では 1 個のブロードなピークとして観測されたが、D-2 においては、4 個のダブルットシグナルとして観測された。これは、16、17 位にエポキシ基が導入されたことにより、かさ高いジイソプロピルアミノ基の自由回転が完全に阻害され、すべてのメチル基が非等価に観測されたことによると考えられた。

同様に D-2 の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいても、KW-2581 に比べて 16 位および 17 位の炭素は大きく高磁場にシフトし、隣接する 13 位および 15 位の炭素も高磁場に

シフトすると考えられたが、実際 D-2 の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいては、16 位炭素が  $\delta$  125.9 から  $\delta$  60.4 へ、17 位炭素が  $\delta$  150.7 から  $\delta$  70.4 へと大きく高磁場シフトし、13 位炭素が  $\delta$  48.4 から  $\delta$  43.0 へ、15 位炭素が  $\delta$  31.4 から  $\delta$  26.7 へとそれぞれ高磁場へのシフトが観測された。16 位および 17 位の炭素のケミカルシフトは、エポキシド炭素に特徴的な値である。また  $^1\text{H}$  NMR の場合と同様に、ジイソプロピルアミノ基の 4 個のメチル炭素が、すべて非等価に観測された。その他、16、17 位エポキシ基の影響の及ばない部位については、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルともに、KW-2581 とほぼ同様のケミカルシフトを示すことが確認された。以上の結果より、分解物 D-2 は、KW-2581 の 16、17 位エポキシ体であると決定された(Fig. 18b)。

**Table 5.** <sup>1</sup>H NMR spectral assignment of KW-2581, D-1 and D-2 [500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 30°C, δ]<sup>a</sup>

Proton	KW-2581	D-1 (RRT = 0.51)	D-2 (RRT = 0.76)
1-H	7.31(1H, d, <i>J</i> =8.6 Hz)	7.57(1H, d, <i>J</i> =8.5 Hz)	7.29(1H, d, <i>J</i> =8.5 Hz)
2-H	7.02(1H, dd, <i>J</i> =8.6, 2.4 Hz)	7.48(1H, dd, <i>J</i> =8.5, 2.8 Hz)	7.00(1H, dd, <i>J</i> =8.5, 2.5 Hz)
3-OSO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	7.86(2H, s)	8.01(2H, s)	7.84(2H, s)
4-H	6.98(1H, d, <i>J</i> =2.4 Hz)	7.76(1H, d, <i>J</i> =2.8 Hz)	6.96(1H, d, <i>J</i> =2.5 Hz)
6-H	2.87(2H, m)	—	2.82(2H, m)
7-H <sub>ax</sub>	1.44(1H, m)	2.51 <sup>d</sup> (1H, dd, <i>J</i> =16.9, 13.2 Hz)	<i>ca.</i> 1.4 <sup>h</sup> (6H, m)
7-H <sub>eq</sub>	1.89(1H, m)	2.64(1H, dd, <i>J</i> =3.6, 16.9 Hz)	<i>ca.</i> 1.8 <sup>i</sup> (3H, m)
8-H	<i>ca.</i> 1.5 <sup>b</sup> (3H, m)	2.06 <sup>e</sup> (2H, m)	1.46 <sup>j</sup> (2H, m)
9-H	<i>ca.</i> 2.3 <sup>c</sup> (3H, m)	2.71(1H, m)	2.24(1H, td-like, <i>J</i> =12, 4)
11-H <sub>ax</sub>	<i>ca.</i> 1.5 <sup>b</sup> (3H, m)	1.61 <sup>f</sup> (2H, m)	1.46 <sup>j</sup> (2H, m)
11-H <sub>eq</sub>	<i>ca.</i> 2.3 <sup>c</sup> (3H, br.d, <i>J</i> =11 Hz)	2.44(1H, br.d, <i>J</i> =13 Hz)	2.39(1H, m)
12-H <sub>ax</sub>	<i>ca.</i> 1.5 <sup>b</sup> (3H, m)	1.61 <sup>f</sup> (2H, m)	<i>ca.</i> 1.8 <sup>i</sup> (3H, m)
12-H <sub>eq</sub>	1.79(1H, d-like, <i>J</i> =10.6 Hz)	1.81 <sup>g</sup> (2H, m)	<i>ca.</i> 1.4 <sup>h</sup> (6H, m)
14-H	1.62(1H, m)	1.81 <sup>g</sup> (2H, m)	<i>ca.</i> 1.4 <sup>h</sup> (6H, m)
15-H <sub>α</sub>	2.06(1H, dd, <i>J</i> =14, 11 Hz)	2.06 <sup>e</sup> (2H, m)	<i>ca.</i> 1.4 <sup>h</sup> (6H, m)
15-H <sub>β</sub>	<i>ca.</i> 2.3 <sup>c</sup> (3H, ddd-like, <i>J</i> =14, 6, 3 Hz)	2.26(1H, ddd, <i>J</i> =15.3, 6.5, 3.2 Hz)	1.88(1H, dd-like, <i>J</i> =11, 4 Hz)
16-H	5.64(1H, d, <i>J</i> =1.3 Hz)	5.65(1H, dd, <i>J</i> =2, 3 Hz)	3.47(1H, s)
18-H	0.99(3H, s)	0.97(3H, s)	0.88(3H, s)
19-N(CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	4.17(1H, br.s), 3.49(1H, br.s)	uncertain	4.25(1H, sep, <i>J</i> =6.6 Hz), 3.44(1H, sep, <i>J</i> =6.6 Hz)
19-N(CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	1.23(12H, br.s)	1.22(12H, br.s)	1.10(3H, d, <i>J</i> =6.6 Hz), 1.20(3H, d, <i>J</i> =6.6 Hz), 1.28(3H, d, <i>J</i> =6.6 Hz), <i>ca.</i> 1.4 <sup>h</sup> (6H, d, <i>J</i> =6.6 Hz)

<sup>a</sup> s: singlet, d: doublet, t: triplet, sep: septet, m: multiplet, dd: doublet of doublets, td: triplet of doublets, ddd: doublet of doublets of doublets, br.s: broad singlet, br.d: broad doublet.

<sup>b, c, e, f, g, h, i, j</sup> These signals overlapped.

<sup>d</sup> This signal overlapped with DMSO.

**Table 6.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectral assignment of KW-2581, D-1 and D-2 [126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $\delta$ ]

Carbon	KW-2581	D-1	D-2
C-1	126.3	127.5	126.4
C-2	119.3	127.7	119.4
C-3	148.1	148.9	148.2
C-4	122.0	119.7	121.9
C-5	138.0	133.5	137.9
C-6	29.0	196.5	29.0
C-7	27.1	43.6	27.0
C-8	36.5	38.0	36.3
C-9	43.9	42.5	43.7
C-10	138.5	145.5	138.2
C-11	25.9	25.2	25.8
C-12	33.9	33.7	32.5
C-13	48.4	48.3	43.0
C-14	55.4	54.8	43.9
C-15	31.4	31.2	26.7
C-16	125.9	126.0	60.4
C-17	150.7	150.3	70.4
C-18	16.7	16.6	16.0
C-19	167.8	167.7	164.9
19-N( <u>C</u> H(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	uncertain	uncertain	45.0, 48.4
19-N(CH( <u>C</u> H <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	20.7, 20.8	20.7, 20.9	20.1, 20.5, 20.9, 20.9

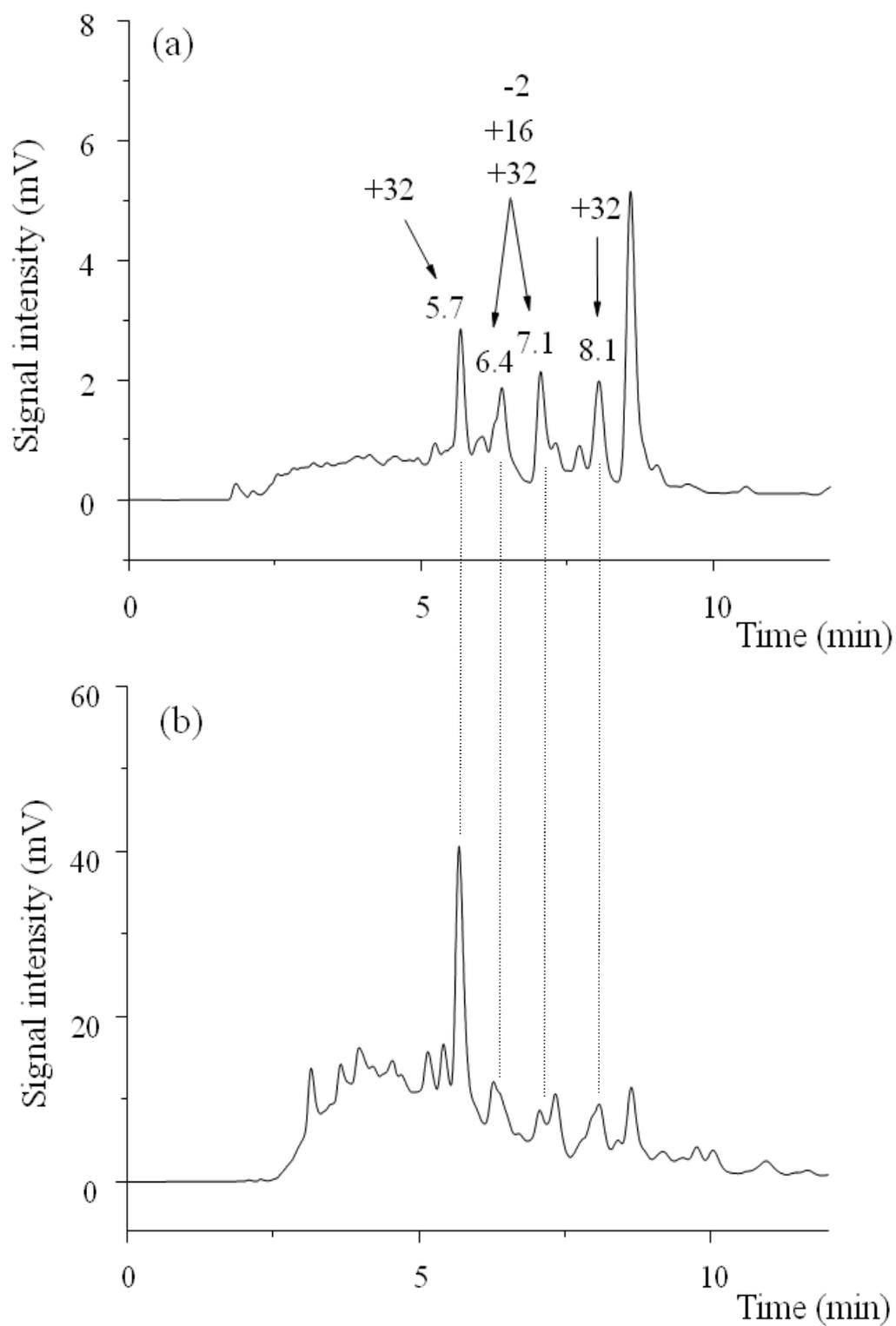
### III-3 分解物 (相対保持時間 0.34–0.48)の構造決定

MS および UV スペクトルの解析から、その他の主な分解物(相対保持時間 0.34–0.48)は、KW-2581 の様々な酸化体(エポキシ体、水酸化体、オキシ体など)と推定された。そこで非選択的にこのような多数の酸化体を合成的に得るために、KW-2581 への Fenton 酸化を検討した。Fenton 酸化の反応機構に関しては、現在においても未だ正確には解明されてはいないが、一般的には二価の鉄イオンによる過酸化水素の一電子還元により生成するヒドロキシルラジカルがイニシエーターとなり、次々にラジカル反応が進行するとされており、非選択的に様々な酸化体が得られることで知られている<sup>48-53)</sup>。

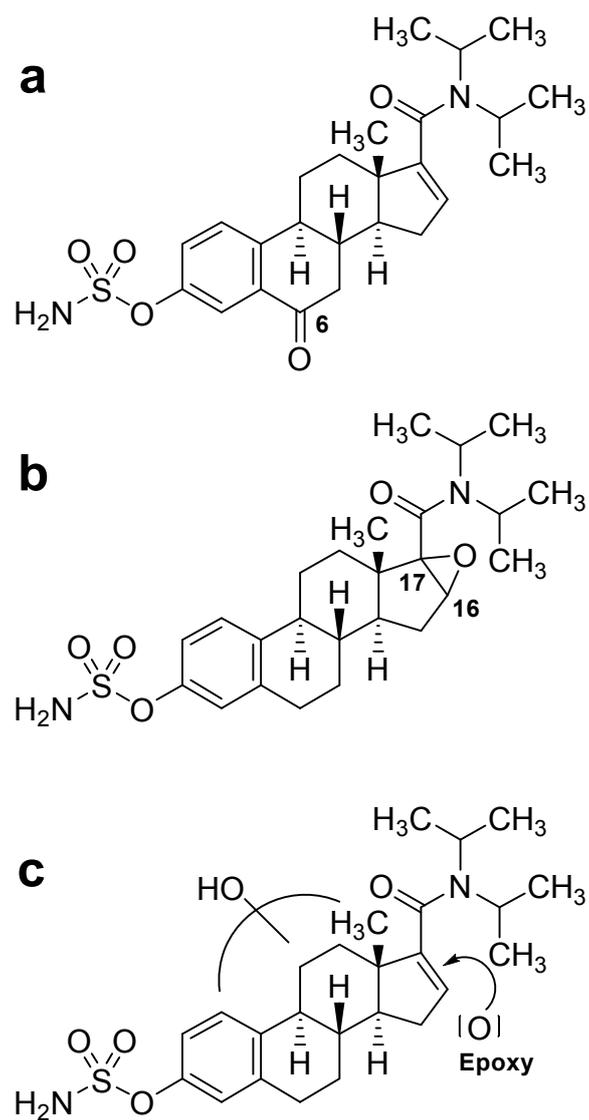


KW-2581 の Fenton 酸化で得られた生成物と苛酷条件(70°C) 1 ヶ月保存試料中に観測された分解物(相対保持時間 0.34–0.48)との HPLC クロマトグラムの比較を Figure 17 に示す。これらクロマトグラムのプロファイルは異なるものの、両方のクロマトグラムにおける主なピークは、同じ相対保持時間(0.34、0.38、0.42 および 0.48)を有し、LC/MS 分析の結果、これらは同じ質量数を有することが確認された。本結果より、Fenton 酸化で得られた化合物プロファイルと苛酷試験(70°C、1 ヶ月)で得られた分解物プロファイルは、類似していることが確認された。以上の結果より、相対保持時間 0.34–0.48 の分解物は、KW-2581 のエポキシ体、水酸化体などの様々な酸化体であると推定された(Fig. 18c)。

合成高分子のメカノラジカル生成に関しては古くから知られており、高せん断ミキサーにより結晶セルロースからラジカルが発生し、原薬品質に影響を与えることが知られている<sup>54)</sup>。一方、低分子化合物の粉砕によるメカノラジカル生成に関してはほとんど報告されていないが、ステンレス製などの金属製の粉砕容器を用いる低分子量化合物の粉砕において、金属表面からの固相一電子移動反応が進行することが実験的に実証されている<sup>55)</sup>。またリボフラビン室温、無酸素条件下、ステンレス製容器内で 1 時間振動ボールミルで粉砕すると、ステンレス容器からリボフラビンへの固相一電子移動反応が進行し、リボフラビンラジカルを生成することが電子スピン共鳴(ESR)スペクトルにより確認されている<sup>56)</sup>。また室温大気中において、市販の錠剤をめのう製自動乳鉢で粉砕した結果、数種の医薬品においてメカノラジカルが生成するという事例が報告されている<sup>57)</sup>。これらの知見および Fenton 酸化を用いたモデル実験の結果より、KW-2581 の Jet mill 粉砕における分解メカニズムを以下のように考察した。つまり本分解は、粉砕工程特異的な結晶化度の低下と吸湿に加えて、ヒドロキシルラジカルまたはステンレス容器の表面における固相一電子移動反応から生じたメカノラジカルが関与する空気酸化に起因すると推察された。



**Figure 17.** HPLC chromatograms of (a) the stress test, 70°C, after 1 month, and (b) the Fenton oxidation for KW-2581 (decimals show retention time and signed integers show mass difference of the degradation product to KW-2581).



**Figure 18.** Chemical structures of (a) D-1 (RRT = 0.51), (b) D-2 (RRT = 0.76), (c) the degradation products (RRT = 0.34-0.48).

## 結 論

KW-2581 の Jet mill 粉砕で観測された品質低下(水分および類縁物質総量の増加)に関して、原因究明に向けた各種検討を実施した。Jet mill 粉砕品中で観測された主な分解物は、HDCE (加水分解体)、9(11)-dehydro-SDCE、6 位オキソ体、16、17 位エポキシ体を始め、KW-2581 の各種酸化化合物であることが、分光学的および合成的アプローチにより明らかにされた。本結果より、KW-2581 の Jet mill 粉砕で生じた分解は、粉砕工程特異的な結晶化度の低下と吸湿に加えて、ヒドロキシルラジカルまたはステンレス容器の表面における固相一電子移動反応から生じたメカノラジカルの生成による酸化分解反応であると推察された。今後の課題としては、KW-2581 の Jet mill 粉砕時の分解メカニズムの完全解明に向けて、電子スピン共鳴(Electron Spin Resonance)スペクトルの測定によるラジカルの生成確認が挙げられる。またラジカルスカベンジャー<sup>58)</sup>の添加による粉砕時の分解抑制効果の有無についても、興味を持たれる。

本知見に従うと、KW-2581 の Jet mill 粉砕品は、減圧乾燥することで分解が抑えられ保存安定性が向上すると考えられるが、実際 Jet mill 粉砕後に乾燥工程を追加することで、分解抑制されることが確認されている。このように乾燥工程の追加は、粉砕品の安定性の向上に効果的であることから、KW-2581 原薬の分解をコントロールするための Quality by Design (QbD)アプローチとして非常に有用である。また粉砕試料において観測される品質の低下は、医薬品および製薬産業にとって極めて重要な品質問題である。生じた分解物の同定およびその構造に基づいた分解経路の解明により、品質低下の主要因を明らかにすることは、医薬品の品質管理を行う上で、重要なツールとなり得る。筆者の知る限り Jet mill 粉砕で生じた分解物に関して詳細に解析した例は報告されていないことから、本研究は医薬品の Jet mill 粉砕中に発生した分解のメカニズム解明に向けて有用な知見を与えるものであり、医薬品の Jet mill 粉砕における品質低下の発生率低減を目的とした、さらなるアイデアの創出につながるものと期待される。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東邦大学薬学部 薬剤学教室 寺田勝英 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の実施と発表の機会を与えてくださり、終始多大なる御支援と御配慮を賜りました協和発酵キリン株式会社 製剤研究所 前所長 安澤亨 博士、友田寛 所長、CMC 開発部 山内雅博 博士、ならびに同会社幹部の方々に厚く御礼申し上げます。

本稿をまとめるにあたり、ステロイドスルファターゼ阻害剤に関してご教示を賜りました協和発酵キリン株式会社 製品ポートフォリオ戦略部 中田泰介 博士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、種々の有益な御助言ならびに X 線結晶構造解析に関してご協力頂きました協和発酵キリン株式会社 製剤研究所 松宮茂樹 博士に深く感謝致します。

本研究の推進にあたり、終始多大なる御協力と御助言を賜りました第一ファインケミカル株式会社 品質保証部 喜多正次マネージャー、協和発酵キリン株式会社 高崎工場 西村暁 氏、製剤研究所 徳田拓弥 主任研究員、三村明弘 研究員、南憲二 研究員、加藤晴美 女史ならびに製剤研究所所員の皆様に深く感謝致します。

常日頃から激励していただきました諸先輩方、すべての友人に心から感謝致します。

最後に、本研究において常日頃から精神面、生活面など様々な面で支えてくれた家族、両親に深く感謝の意を表します。

## 実験の部

### 【1】 試薬

KW-2581 は協和発酵キリン株式会社で合成されたものを用いた。Jet mill 粉碎品は、海外の粉碎受託機関において Jet mill 粉碎(窒素ガス)されたものを用いた。Jet mill 粉碎品は、特に断り書きがなければ 3 回粉碎されたもの(Lot 0207M01)を用いた。試薬は以下に記載の市販品を購入し、特に処理せずそのまま使用した。

- ・ アクアライト CN  
水分測定用 (平沼産業(株)製)
- ・ アクアライト RS  
水分測定用 (平沼産業(株)製)
- ・ アセトニトリル  
HPLC 用 (キシダ化学(株)製)
- ・ 塩化ナトリウム  
99.5%以上 (キシダ化学(株)製)
- ・ 過酸化水素水  
31% (三菱ガス化学(株)製)
- ・ クロロホルム  
99.0%以上 (キシダ化学(株)製)
- ・ 酢酸エチル  
99.5%以上 (キシダ化学(株)製)
- ・ ジエチルエーテル  
99.5%以上 (キシダ化学(株)製)
- ・ ジクロロメタン  
99.0%以上 (キシダ化学(株)製)  
有機合成用 (和光純薬工業(株)製)
- ・ ジメチルスルホキシド- $d_6$   
NMR 測定用、重水素化率 99.9% (Sigma-Aldrich (旧 Isotec Inc.)製)
- ・ 重水  
NMR 測定用、重水素化率 99.8% (メルク(株)(旧メルク・ジャパン(株))製)
- ・ 硝酸カリウム  
99.0%以上 (キシダ化学(株)製)
- ・ シリカゲル  
カラムクロマトグラフ用 (和光純薬工業(株)製)

- ・セライト  
昭和化学工業(株)製
- ・炭酸ナトリウム  
99.5%以上 (キシダ化学(株)製)
- ・PCC  
98% (Sigma-Aldrich (旧 Aldrich Chemical Company)製)
- ・ヘキサン  
HPLC 用 (キシダ化学(株)製)
- ・水  
メルク(株)(旧日本ミリポア(株))製 Milli-Q により精製した超純水。
- ・*m*-CPBA  
70%以上 (石津製薬(株)製)
- ・メタノール  
HPLC 用 (キシダ化学(株)製)
- ・硫酸  
97.0%以上 (キシダ化学(株)製)
- ・硫酸鉄(II)・7水和物  
99.0~102.0% (キシダ化学(株)製)
- ・硫酸マグネシウム  
98.0~101.0% (石津製薬(株)製)
- ・リン酸  
85.0%以上 (キシダ化学(株)製)

## 【2】測定機器

- ・SEM  
VE-8800 ((株)キーエンス製)
- ・NMR  
AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン(株)製)
- ・恒温恒湿試験器  
PR-2ST (エスペック(株)製)
- ・高速液体クロマトグラフ  
La Chrom ((株)日立製作所製)  
LC-10AD ((株)島津製作所製)
- ・高速液体クロマトグラフ質量分析計  
HPLC: Agilent 1100 (Agilent Technologies 製)  
MS: Micromass LCT (Waters Corporation (旧 Micromass UK Limited)製)

- ・ 電子天秤  
R200D (ザルトリウス・ジャパン(株)(旧ザルトリウス(株))製)
- ・ 微量水分測定装置  
AQ-7 (平沼産業(株)製)
- ・ 粉末 X 線回折装置  
JDX-3530 (日本電子(株)製)
- ・ pH 計  
F-22 ((株)堀場製作所製)

### 【3】 乳鉢粉砕

めのう乳鉢(外径 90 mm、内径 75 mm、深さ 20.5 mm)とめのう乳棒(直径 20 mm、長さ 95 mm)を用い、5 分間手動で粉砕を行った。

### 【4】 粉末 X 線回折による結晶形の確認および結晶化度の測定

粉末 X 線回折装置 JDX-3530 を用い、KW-2581 の結晶形の確認および結晶化度の測定を実施した。固有 X 線には Cu K $\alpha$ 線を用い、回折角 5~40°の範囲でステップ角度 0.04°、計数時間 0.60 sec、管球電圧 40 kV、管球電流 30 mA に設定して回折ピークを測定した。ただし結晶化度の測定においては、回折角 5~100°の範囲で測定を行った。なお、モノクロメーターは使用せず、Ni フィルタを用いて測定した。結晶化度の計算には、本システムに付属のソフトウェア(Vonk 法<sup>59)</sup>)を用いて算出した。

### 【5】 SEM を用いた粒子径の評価

二次電子検出器を備えた走査型電子顕微鏡 VE-8800 を用いて、KW-2581 の粒子径を評価した。電圧は 20 kV で測定を行った。

### 【6】 吸湿性試験

KW-2581 の約 1.0 g をシャーレに精密に量り、室温下、湿度を 75%および 93%にそれぞれ調節したデシケータ中に放置し、その重量変化による吸湿性の有無を試験開始時、1 日後、3 日後、7 日後にそれぞれ評価した。なお、試料が均一に湿気に触れるよう、シャーレ内における試料の厚みは、目視で 2 mm 以下になるよう調整した。

試験は塩化ナトリウム飽和溶液(75%RH)および硝酸カリウム飽和溶液(93%RH)の 2 種類の湿度条件下で行った。吸水量の計算方法を以下に示す。

$$\text{吸水量(\%)} = \frac{[\text{加湿後のサンプル重量}] - [\text{加湿前のサンプル重量}]}{\text{加湿前のサンプル重量}} \times 100$$

またカールフィッシャー水分測定装置を用いて、それぞれの試料について試験開始時と7日後に電量滴定法による水分測定を行った。

## 【7】苛酷試験

恒温恒湿槽 PR-2ST 内で温度条件(70°C)または湿度条件(25°C、93%RH)の苛酷条件下に KW-2581 を7日間保存し、原薬の固体状態での安定性を調べた。安定性については、保存開始時、3日後および7日後に以下に示す HPLC を用いた類縁物質試験を行い、各類縁物質の定量値を評価した。なお分解物の増加が顕著であった温度条件(70°C)については、1ヵ月後についても試験を実施した。

## 【8】類縁物質試験

KW-2581 40 mg をアセトニトリルでメスフラスコ 20 mL に溶かし、試料溶液とした。この液 1 mL を正確に量り、アセトニトリルを加えて正確にメスフラスコ 100 mL とし、標準溶液とした。

試料溶液および標準溶液 5 μL につき、次の試験条件で液体クロマトグラフ法により試験を行い、それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定した。各類縁物質の含量(%)は下記の式から算出し、類縁物質合計(%)については、試験条件 A における各々の成分(%)を総計した。ただし本研究において、個々の類縁物質の正確な定量は必要ではないことから、各類縁物質の含量については、モル吸光係数での補正はしていない。HPLC システムは LaChrom または LC-10AD を用いた。

$$\text{各々の成分(\%)} = \frac{\text{試料溶液から得られる KW-2581 以外の各々の成分のピーク面積}}{\text{標準溶液から得られる KW-2581 のピーク面積}}$$

### [試験条件 A]

- 検出器 : 紫外吸光光度計(測定波長: 215 nm)
- カラム : J'sphere ODS-H80 (4 μm、4.6×250 mm、(株)YMC)
- カラム温度 : 35°C 付近の一定温度
- 移動相 : リン酸水溶液(pH 3.3) / アセトニトリル (2 : 3、v/v)  
水 1300 mL に薄めたリン酸(1→10)を加えて pH 3.3 に調整する。  
この液 1200 mL をとり、アセトニトリル 1800 mL を加える。
- 流量 : 1.0 mL/min (KW-2581 の保持時間が約 17 分。)
- 面積測定範囲 : 溶媒のピークの後から KW-2581 の保持時間の約 2 倍の範囲。
- 注入量 : 5 μL

## 【9】 KW-2581 の結晶構造解析

KW-2581 未粉碎品の粉末をリンデマンガラス製毛細管 (mark-tube、special glass No. 0140、直径 0.30 mm、肉厚 0.01 mm、Hilgenberg、Malsfeld、Germany)に詰めた試料を用いて、粉末 X 線回折法による結晶構造解析を実施した。大型放射光施設 SPring-8 の産業利用ビームライン I (BL19B2)に設置された大型デバイシェラーカメラ<sup>60)</sup>を用いて、 $\lambda = 0.80000 \text{ \AA}$ 、295 K で露光を行った後、カメラに装着されたイメージングプレート (IP) (BAS-MS2040、富士フイルム、東京)に記録された PXRD 画像を、IP 読取機 (BAS-2500、富士フイルム)で読み取り、BL19B2 に設置されている粉末 X 線データ処理プログラム (ImageJ ver. 1.46<sup>61)</sup> (National Institute of Health, Bethesda, MD, United States)、Powder Tools ver. 3.1 (高輝度光科学研究センター、兵庫))を用いて 2 $\theta$ -I 形式のデータ(2 $\theta = 0.01$ –78.09°、ステップ幅 0.01°)に変換した (付図の部 Fig. A4)。本文では、Figure A4 のデータを「生データ」と呼ぶ。

生データを粉末結晶構造解析プログラム DASH ver. 3.2<sup>62)</sup> (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, United Kingdom)に読み込ませ、2 $\theta = 2.00$ –26.43° (分解能 22.92–1.75  $\text{\AA}$ )の範囲のデータを用いて、DICVOL06<sup>63)</sup> (Daniel Louër, Chantepie, France)による指数付け、空間群の決定、SA 法<sup>64, 65)</sup>による初期構造の決定を行った。SA 法の探索モデルは、類似の骨格を持つ自社化合物の単結晶構造(未発表)を基に作成し、分子軌道法プログラム MOPAC 7 の PM3 法で構造精密化を行ったものを二分子用いた。SA 法の解のうち、 $\chi^2$  値が最も小さなものを、生データとともに粉末結晶構造解析プログラム PDXL ver. 2.0.3.0 (リガク、東京)に読み込ませ、2 $\theta = 2.00$ –60.00° (分解能 22.92–0.80  $\text{\AA}$ )のデータを用いてリートベルト法<sup>66)</sup>による構造精密化を行い、最終構造を得た。

## 【10】 分解物の構造決定

### (1) LC/MS

苛酷試験において KW-2581 の温度条件(70°C)下、1 ヶ月目の試料中に観測された主な分解物について、エレクトロスプレーイオン化法(ESI 法)により MS スペクトルを測定した。HPLC 条件および試料については、苛酷試験における類縁物質試験法の試験条件 A および試料溶液を用いた。ただし LC からの出力流量は、MS 部に導入する前にポストカラムフロープリッターで半分の 0.5 mL/min とした。MS スペクトルは LC/MS (LC: Agilent 1100、MS: Micromass LCT)を用いて測定した。また主な分解生成物の交換性水素の数を調べるために、重水を用いた LC/MS についても測定を行った。以下に質量分析計における測定条件および重水を含む移動相の調製法を示す。

### 【MS 測定条件(TOF 型質量分析計: LCT)】

イオン化法	: ESI <sup>+</sup> および ESI <sup>-</sup>
Capillary	: 3500 V
Sample Cone	: 20~95 V
RF Lens	: 100 V
Extraction Cone	: 3 V
Source Temp.	: 150°C
Desolvation Temp.	: 350°C
質量測定範囲	: <i>m/z</i> 100~1000
移動相	: リン酸重水溶液(pH 3.3) / アセトニトリル (2 : 3、v/v) 重水 420 mL に薄めたリン酸(1→10)を加えて pH 3.3 に調整する。この液 400 mL をとり、アセトニトリル 600 mL を加える。

## (2) LC/UV

苛酷試験において KW-2581 の温度条件(70°C)下、1 ヶ月目の試料中に観測された主な分解物について、フォトダイオードアレイ検出器により UV スペクトルを測定した。HPLC 条件については、検出器および注入量を除き、苛酷試験における類縁物質試験法の試験条件 A と同一の条件を用いた。以下に試料溶液の調製方法を示す。

### 試料溶液の調製方法

KW-2581 の温度条件(70°C)下、1 ヶ月目の試料 2 mg をアセトニトリル 1 mL に溶かし、試料溶液とした。本液 20  $\mu$ L につき試験を行った。

## (3) NMR スペクトル

単離精製された D-1 (RRT = 0.51)および D-2 (RRT = 0.76)について <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C、C-H COSY および HMBC の測定を行った。ただし D-2 については、DEPT についても測定を行った。またこれら化合物の帰属の一助とするため、KW-2581 の未粉碎品についても同様に測定を行った。各測定には AVANCE500 spectrometer の標準プログラムを使用した。<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR の測定溶媒には DMSO-*d*<sub>6</sub> (内部標準物質として、0.05% (v/v) TMS 含有)を用い、測定温度は 30°C に設定した。また NMR 用サンプルチューブには Wilmad Glass Co., Ltd 製のものを用いた。

<sup>1</sup>H NMR 測定はスペクトル幅 10331 Hz、データポイント 32768 で、<sup>13</sup>C NMR 測定はスペクトル幅 30030 Hz、データポイント 65536 でそれぞれ行った。C-H COSY はデータポイント 1024×2048 (f1×f2)、その他の 2D NMR 測定はデータポイント 1024×1024 (f1×f2)で測定を行った。

## 試料溶液の調製方法

試料約 6 mg～約 20 mg を 0.05% TMS 入り DMSO- $d_6$  約 0.6 mL に溶解し、外径 5 mm の NMR 用サンプルチューブに注入した。

### (4) 分解物 D-1 (RRT = 0.51)の合成

以下の手順により KW-2581 について PCC 酸化を実施した。

KW-2581 未粉碎品(0.1 g、 $2.2 \times 10^{-1}$  mmol)のジクロロメタン溶液(25 mL)に PCC (2.8 g、13 mmol)およびモレキュラーシーブ(2.8 g)を添加し、室温で 24 時間攪拌した。反応液の 1 mL を採取し、ジエチルエーテルを加えた後、セライトを用いて吸引ろ過を行った。得られたろ液を減圧濃縮し、アセトニトリルで希釈した後、HPLC 分析を行った。また本溶液を用いて、LC/MS を用いた MS スペクトルおよびフォトダイオードアレイ検出器を用いた UV スペクトルの測定を行った。HPLC 条件は類縁物質試験法の試験条件 A に、MS 条件は分解物の構造決定における MS 測定条件に従った。

### (5) 分解物 D-1 (RRT = 0.51)の単離

KW-2581 未粉碎品(0.2 g、 $4.3 \times 10^{-1}$  mmol)のジクロロメタン溶液(35 mL)に PCC (2.8 g、13 mmol)およびモレキュラーシーブ(2.8 g)を添加し、室温で 92 時間攪拌した。HPLC により反応の進捗を確認後、反応液にジエチルエーテル(50 mL)を加え、セライトを用いて吸引ろ過を行った。得られたろ液を減圧濃縮し、粗生成物約 0.22 g を得た。これをヘキサン:酢酸エチル(1:1)混液を展開相とするシリカゲルプレパラティブ TLC およびヘキサン:酢酸エチル(3:2)混液を展開相とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、約 6 mg の D-1 を得た。

### (6) 分解物 D-2 (RRT = 0.76)の合成

以下の手順により KW-2581 について *m*-CPBA 酸化<sup>67)</sup>を実施した。

KW-2581 未粉碎品(50 mg、 $1.1 \times 10^{-1}$  mmol)のジクロロメタン溶液(2 mL)に *m*-CPBA (27 mg、 $1.1 \times 10^{-1}$  mmol)を添加し、室温で 17 時間攪拌した。反応液をパスツールピペットで HPLC バイアル瓶に 1 滴採取し、窒素ガスで濃縮乾燥した後、アセトニトリル約 1 mL で希釈し、HPLC 分析を行った。また本溶液を用いて、LC/MS を用いた MS スペクトルの測定を行った。HPLC 条件は類縁物質試験法の試験条件 A に、MS 条件は分解物の構造決定における MS 測定条件に従った。

### (7) 分解物 D-2 (RRT = 0.76)の単離

室温で 17 時間攪拌した上記反応液につき、ジクロロメタン:10% 炭酸ナトリウム水で抽出を行い、ジクロロメタン相を硫酸マグネシウムで乾燥した。本有機溶媒相

を減圧濃縮し、粗生成物約 0.11 g を得た。これをクロロホルム:メタノール(10:1)混液を展開相とするシリカゲルプレパラティブ TLC により精製し、約 15 mg の D-2 を得た。

#### (8) 分解物(RRT = 0.34–0.48)の合成 (Fenton 酸化)

以下の手順により KW-2581 について Fenton 酸化を実施した。

KW-2581 未粉碎品(0.1 g、 $2.2 \times 10^{-1}$  mmol)のアセトニトリル溶液(15 mL)に、5%硫酸(15 mL)および硫酸鉄(II) 7 水和物(1.0 g、3.7 mmol)の 5%硫酸溶液(25 mL)を添加後、5 分間攪拌した。この反応液に 31%過酸化水素水(1.3 g、12 mmol)を 5 分以上かけてゆっくり滴下し、室温で 18 時間攪拌した。反応液の 1 mL を採取し、ジエチルエーテル:水(1:1)混液で抽出し、得られたジエチルエーテル相を減圧濃縮した後、アセトニトリルで希釈し、HPLC 分析を行った。また本溶液を用いて、LC/MS を用いた MS スペクトルの測定を行った。HPLC 条件は類縁物質試験法の試験条件 A に、MS 条件は分解物の構造決定における MS 測定条件に従った。

## 付 表

**Table A1.** Details of structure analysis of KW-2581. 1 Å = 10<sup>-10</sup> m.

<b>Crystal data</b>	
Molecular formula:	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S
Molecular weight:	460.63
Crystal system:	Monoclinic
Space group:	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> / Å	11.07077(11)
<i>b</i> / Å	12.92924(14)
<i>c</i> / Å	18.0476(3)
$\alpha$ / °	90
$\beta$ / °	95.4957(8)
$\gamma$ / °	90
<i>V</i> / Å <sup>3</sup>	2571.40(5)
<i>Z</i>	4
X-ray source	Synchrotron radiation
Beam line	SPring-8 BL19B2
$\lambda$ / Å	0.80000
$\mu$ / mm <sup>-1</sup>	0.21
<i>T</i> / K	295
Specimen color	White
Specimen shape	Cylinder
Specimen length	3.0 mm
Specimen diameter	0.3 mm
<b>Data collection</b>	
Diffractometer	Debye-Scherrer camera
Specimen mounting	Capillary
Data collection mode	Transmission
Scan method	Stationary detector
$2\theta_{\min}$ / °	0.01
$2\theta_{\max}$ / °	78.09
<b>Refinement</b>	
$2\theta_{\min}$ / °	2.00
$2\theta_{\max}$ / °	60.00
<i>R</i> <sub>p</sub>	0.0165
<i>R</i> <sub>wp</sub>	0.0228
<i>R</i> <sub>exp</sub>	0.0205
<i>S</i>	1.0847
$\chi^2$	1.1766
Number of data points	5801
Number of parameters	446
Number of restraints	420
Treatment of hydrogen atoms	refined using bond distance and bond angle restraints

**Table A2.** Selected dihedral angles (°) of KW-2581.

Atoms	Molecule A	Molecule B
C2–C3–O1–S1*	-82	-98
C3–O1–S1–N1*	-71	169
C16–C17–C18–N2*	84	81
C16–C17–C18–O4	-109	-101
C17–C18–N2–C20*	176	-179
C17–C18–N2–C23	-11	-4
C18–N2–C20–C21*	54	58
C18–N2–C20–C22	-68	-60
C18–N2–C23–C24*	-122	-117
C18–N2–C23–C25	116	125

\*) Angles used for simulated annealing.

**Table A3.** Fractional coordinates of KW-2581.  $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ . All atoms were refined using identical isotropic displacement factor ( $U_{\text{iso}}$ ) which converged to  $0.0688(13) \text{ \AA}^2$ .

Atom	$x$	$y$	$z$
<b>Molecule A</b>			
C1	0.7522(9)	0.5385(10)	0.9984(6)
C2	0.7343(9)	0.5213(10)	1.0718(6)
C3	0.7908(8)	0.4425(8)	1.1087(5)
C4	0.8611(10)	0.3803(9)	1.0756(7)
C5	0.8831(9)	0.3986(9)	1.0010(6)
C6	0.9721(10)	0.3291(9)	0.9667(7)
C7	0.9851(12)	0.3468(10)	0.8856(6)
C8	0.9720(8)	0.4591(9)	0.8625(5)
C9	0.8437(7)	0.4979(8)	0.8811(5)
C10	0.8225(8)	0.4786(9)	0.9618(6)
C11	0.8150(10)	0.6067(9)	0.8528(6)
C12	0.8311(9)	0.6158(10)	0.7716(6)
C13	0.9604(7)	0.5825(8)	0.7571(4)
C14	0.9795(8)	0.4744(8)	0.7790(5)
C15	1.0868(10)	0.4407(10)	0.7385(7)
C16	1.0673(11)	0.5035(11)	0.6680(6)
C17	0.9919(8)	0.5797(9)	0.6771(5)
C18	0.9565(8)	0.6656(8)	0.6257(5)
C19	1.0536(11)	0.6496(11)	0.7994(6)
C20	0.8223(8)	0.7369(9)	0.5204(5)
C21	0.9269(13)	0.7875(11)	0.4865(9)
C22	0.7592(14)	0.8143(13)	0.5649(8)
C23	0.8177(8)	0.5400(8)	0.5511(5)
C24	0.8325(13)	0.5118(12)	0.4649(7)
C25	0.6827(10)	0.5339(12)	0.5671(8)
N1	0.9540(10)	0.4453(10)	1.2691(8)
N2	0.8656(8)	0.6492(8)	0.5698(5)
O1	0.7581(8)	0.4139(8)	1.1791(6)
O2	0.7504(10)	0.4366(9)	1.3138(6)
O3	0.8021(9)	0.5784(7)	1.2373(6)
O4	0.9940(10)	0.7546(10)	0.6431(6)
S1*	0.8127(4)	0.47504	1.2536(3)

*(continued on next page)*

**Table A3** (continued).

---

H1	0.7054(16)	0.6017(14)	0.9692(10)
H2	0.6692(15)	0.5683(15)	1.0988(10)
H3	0.9051(16)	0.3166(13)	1.1061(10)
H4	0.944(3)	0.2493(13)	0.9735(13)
H5	1.0600(16)	0.341(2)	0.9970(10)
H6	0.916(3)	0.3022(14)	0.8533(10)
H7	1.074(2)	0.3202(19)	0.8738(13)
H8	1.0451(14)	0.5017(14)	0.8927(8)
H9	0.7769(13)	0.4504(13)	0.8492(9)
H10	0.876(2)	0.6607(13)	0.8834(9)
H11	0.7217(18)	0.6252(18)	0.8613(11)
H12	0.8162(19)	0.6955(16)	0.7540(11)
H13	0.7647(14)	0.566(2)	0.7398(10)
H14	0.9078(14)	0.4207(13)	0.7631(8)
H15	1.084(2)	0.3586(13)	0.7272(12)
H16	1.1718(14)	0.460(2)	0.7697(10)
H17	1.1057(19)	0.4854(17)	0.6160(10)
H18	1.054(9)	0.633(8)	0.8589(12)
H19	1.143(2)	0.633(8)	0.781(6)
H20	1.031(7)	0.7311(13)	0.789(6)
H21	1.0177(17)	0.5023(16)	1.277(8)
H22	0.981(2)	0.3701(19)	1.265(8)
H23	0.7583(18)	0.7077(13)	0.4759(9)
H24	1.0126(17)	0.764(9)	0.518(5)
H25	0.927(8)	0.763(9)	0.428(3)
H26	0.917(7)	0.8721(14)	0.489(7)
H27	0.827(2)	0.862(7)	0.597(6)
H28	0.702(10)	0.864(7)	0.5272(14)
H29	0.702(10)	0.773(2)	0.603(6)
H30	0.8704(16)	0.4846(13)	0.5866(10)
H31	0.899(10)	0.564(7)	0.443(3)
H32	0.863(12)	0.432(4)	0.4612(16)
H33	0.745(4)	0.521(11)	0.4318(18)
H34	0.629(3)	0.501(11)	0.519(4)
H35	0.674(3)	0.485(9)	0.616(5)
H36	0.650(4)	0.612(2)	0.578(8)

---

*(continued on next page)*

**Table A3** (continued).

---

<b>Molecule B</b>			
C1	0.4061(11)	0.6976(9)	-0.1338(6)
C2	0.4236(11)	0.7145(8)	-0.2086(6)
C3	0.4401(9)	0.6316(7)	-0.2542(5)
C4	0.4391(10)	0.5347(8)	-0.2289(6)
C5	0.4215(10)	0.5185(8)	-0.1539(5)
C6	0.4210(11)	0.4105(9)	-0.1263(6)
C7	0.4225(11)	0.4018(10)	-0.0399(6)
C8	0.3464(8)	0.4816(9)	-0.0067(5)
C9	0.3945(7)	0.5872(8)	-0.0244(5)
C10	0.4044(9)	0.6035(8)	-0.1055(5)
C11	0.3338(10)	0.6730(9)	0.0132(6)
C12	0.3305(11)	0.6546(10)	0.0998(6)
C13	0.2703(7)	0.5524(7)	0.1126(4)
C14	0.3481(7)	0.4717(8)	0.0780(5)
C15	0.3231(11)	0.3711(9)	0.1197(7)
C16	0.3025(12)	0.4115(9)	0.1947(6)
C17	0.2769(9)	0.5107(8)	0.1930(5)
C18	0.2345(8)	0.5708(9)	0.2525(5)
C19	0.1249(11)	0.5519(11)	0.0787(7)
C20	0.2815(8)	0.6658(9)	0.3711(5)
C21	0.1905(13)	0.6024(12)	0.4128(7)
C22	0.2188(15)	0.7619(11)	0.3417(7)
C23	0.4513(8)	0.5745(8)	0.3075(5)
C24	0.4917(12)	0.5121(11)	0.3760(8)
C25	0.5266(11)	0.6698(12)	0.3092(8)
N1	0.4204(10)	0.6906(11)	-0.4651(6)
N2	0.3200(7)	0.6055(9)	0.3079(5)
O1	0.4746(7)	0.6495(9)	-0.3273(6)
O2	0.2640(10)	0.7217(10)	-0.3750(6)
O3	0.3367(10)	0.5419(9)	-0.4051(6)
O4	0.1251(10)	0.5912(10)	0.2500(6)
S1	0.3656(5)	0.6481(6)	-0.3953(3)

---

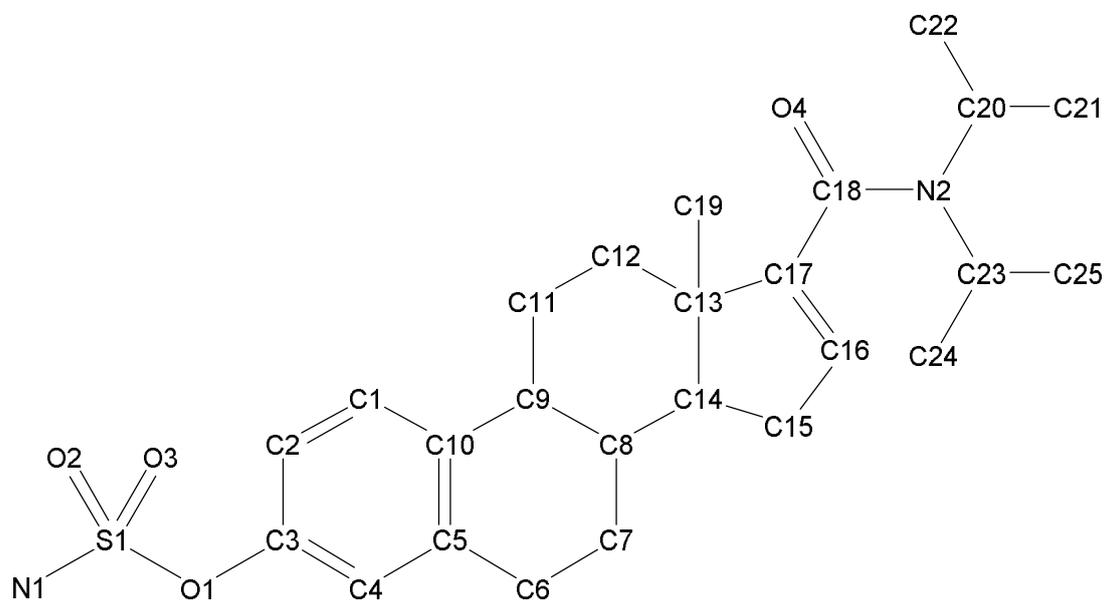
*(continued on next page)*

**Table A3** (*continued*).

H1	0.3946(18)	0.7636(13)	-0.0978(10)
H2	0.4290(17)	0.7932(13)	-0.2299(10)
H3	0.4562(16)	0.4704(13)	-0.2648(9)
H4	0.501(2)	0.3717(16)	-0.1433(12)
H5	0.340(2)	0.3721(16)	-0.1516(11)
H6	0.5148(16)	0.410(2)	-0.0156(11)
H7	0.389(2)	0.3266(13)	-0.0266(11)
H8	0.2541(14)	0.4706(14)	-0.0308(8)
H9	0.4867(13)	0.5904(13)	0.0005(9)
H10	0.2411(17)	0.6798(19)	-0.0121(9)
H11	0.382(2)	0.7441(13)	0.0046(11)
H12	0.280(2)	0.7164(13)	0.1236(11)
H13	0.4236(17)	0.6530(18)	0.1269(11)
H14	0.4452(13)	0.4829(13)	0.0868(8)
H15	0.400(2)	0.3191(14)	0.1225(11)
H16	0.244(2)	0.3311(15)	0.0942(10)
H17	0.308(2)	0.3644(14)	0.2448(9)
H18	0.117(2)	0.578(11)	0.021(3)
H19	0.089(4)	0.474(3)	0.081(7)
H20	0.074(3)	0.603(9)	0.112(5)
H21	0.416(11)	0.7680(15)	-0.476(4)
H22	0.451(11)	0.639(2)	-0.503(3)
H23	0.3605(14)	0.6859(17)	0.4090(9)
H24	0.225(6)	0.524(3)	0.423(7)
H25	0.178(10)	0.639(6)	0.466(4)
H26	0.104(4)	0.599(9)	0.379(4)
H27	0.130(6)	0.768(6)	0.364(6)
H28	0.273(6)	0.8288(17)	0.359(7)
H29	0.206(12)	0.758(5)	0.2809(11)
H30	0.4640(14)	0.5296(15)	0.2572(9)
H31	0.416(4)	0.468(8)	0.393(5)
H32	0.563(9)	0.459(8)	0.363(2)
H33	0.525(12)	0.564(2)	0.421(2)
H34	0.511(10)	0.716(6)	0.358(5)
H35	0.6221(16)	0.6480(18)	0.312(8)
H36	0.502(10)	0.715(6)	0.258(4)

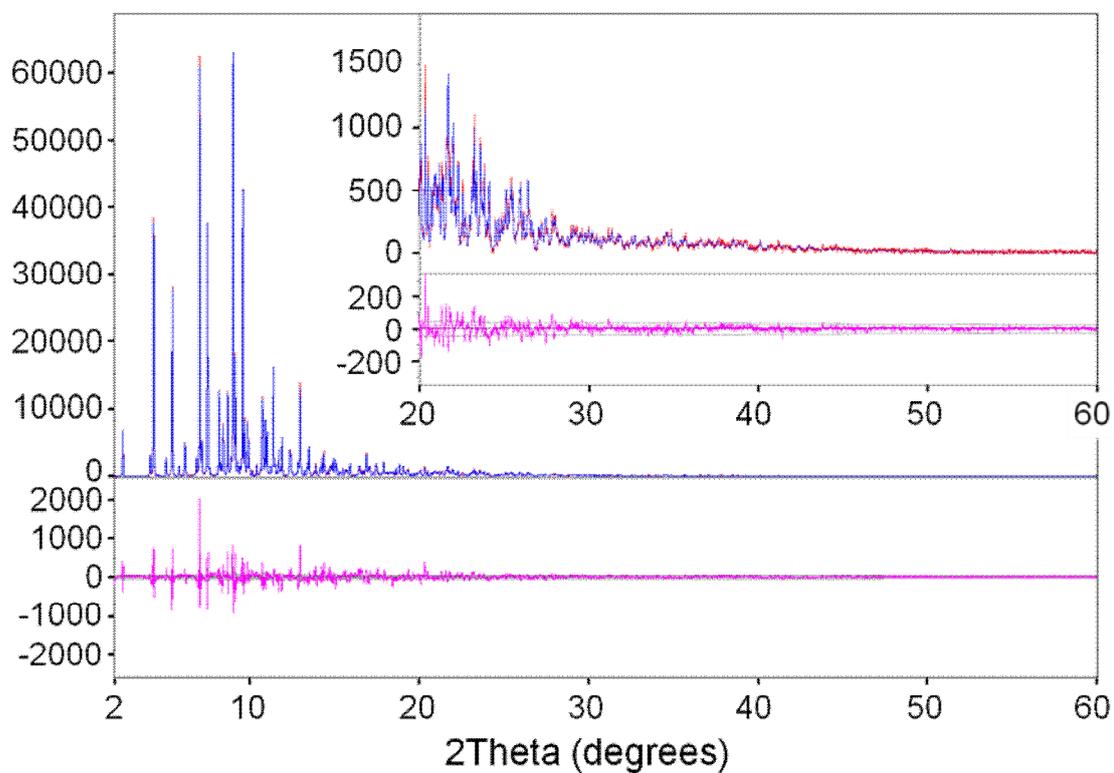
\*) The *y* coordinate of S1 of molecule A was fixed to remove ambiguity of the origin.

付 図

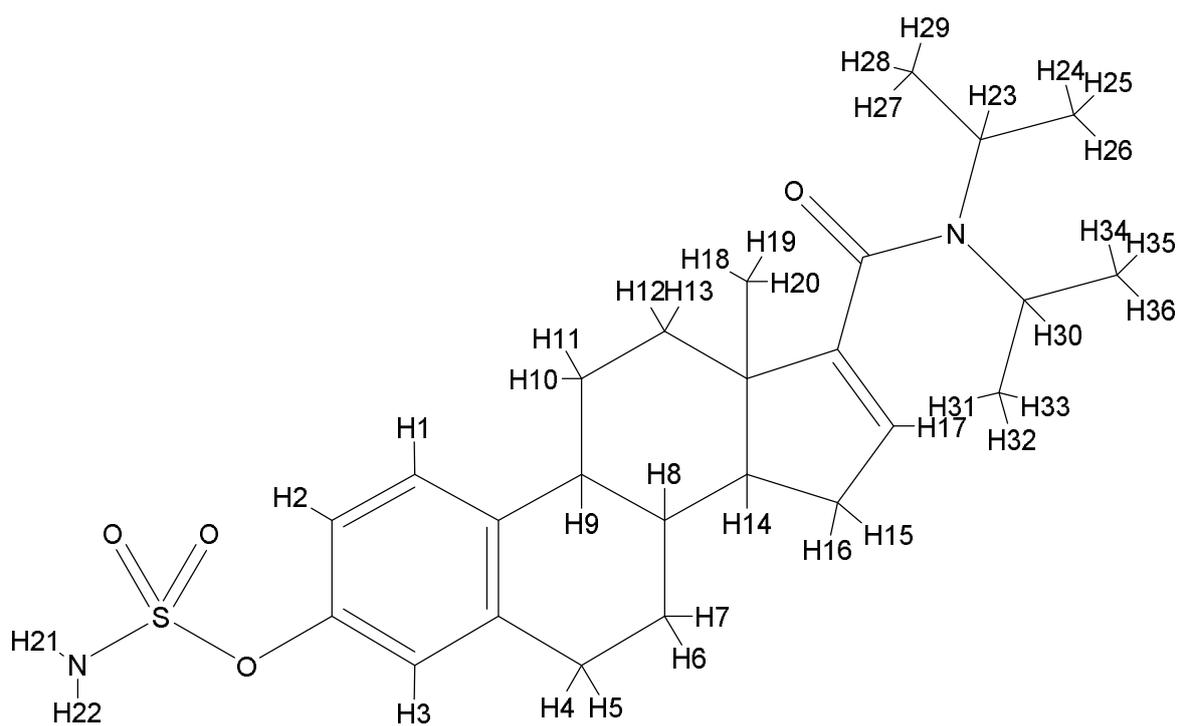


**Figure A1.** Numbering scheme for non-hydrogen atoms of KW-2581.

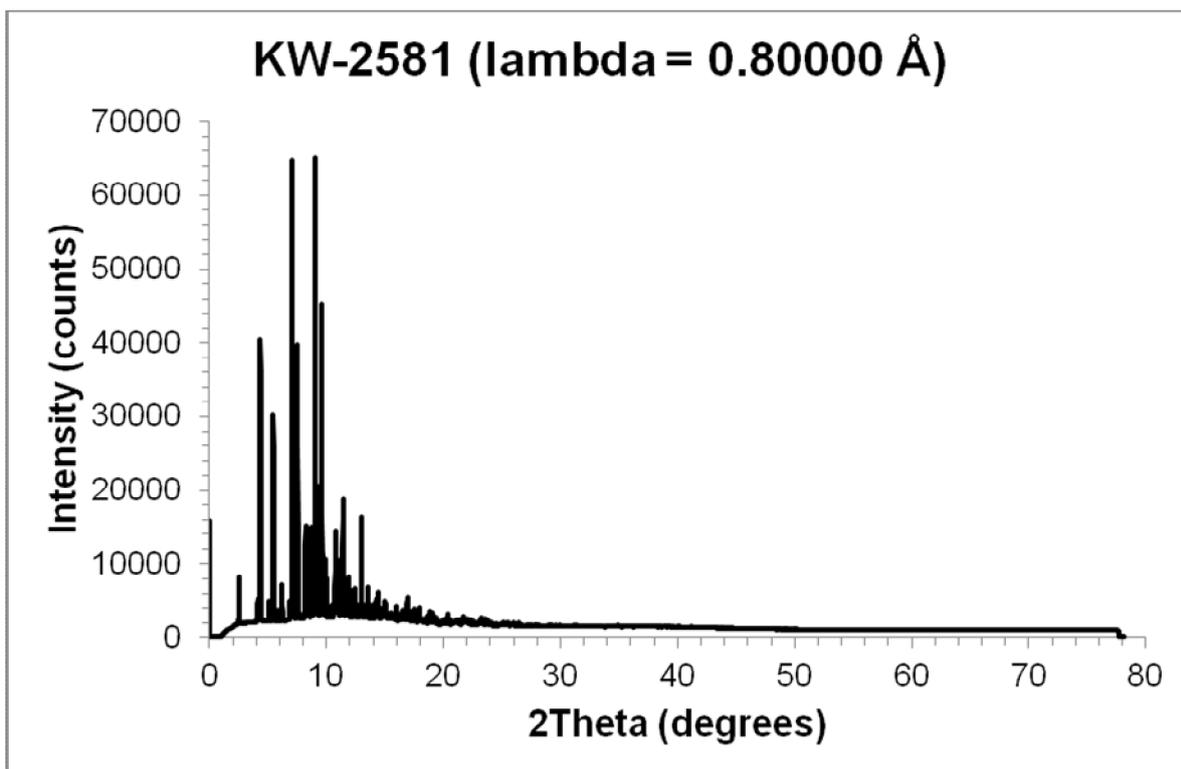
Intensity (counts)



**Figure A2.** Measured (red), calculated (blue) and difference (magenta) powder X-ray diffraction patterns of KW-2581. The insert shows an expansion at  $2\theta = 20\text{--}60^\circ$ .



**Figure A3.** Numbering scheme for hydrogen atoms of KW-2581.



**Figure A4.** Powder X-ray diffractogram of KW-2581 used for crystal structure analysis.

## 引用文献

1. Stein C., Hille A., Seidel J., Rijnbout S., Waheed A., Schmidt B., Geuze H., von Figura K., Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation, and subcellular distribution in BHK-21 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(23), 13865–13872 (1989).
2. Schmidt B., Selmer T., Ingendoh A., von Figura K., A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell*, 82, 271–278 (1995).
3. 清水 宏, あたらしい皮膚科学 第2版, 中山書店 (2011).
4. Oji V., Tadani G., Akiyama M., Bardou C.B., Bodemer C., Bourrat E., Coudiere P., DiGiovanna J.J., Elias P., Fischer J., Fleckman P., Gina M., Harper J., Hashimoto T., Hausser I., Hennies H.C., Hohl D., Hovnanian A., Ishida-Yamamoto A., Jacyk W.K., Leachman S., Leigh I., Mazereeuw-Hautier J., Milstone L., Morice-Picard F., Paller A.S., Richard G., Schmuth M., Shimizu H., Sprecher E., Steensel M.V., Taïeb A., Toro J.R., Vabres P., Vahlquist A., Williams M., Traupe H., Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(4), 607–641 (2010).
5. Mostafa Y.A., Taylor S.D., Steroid derivatives as inhibitors of steroid sulfatase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 183–198 (2013).
6. 長屋直樹, 戸井雅和, 砂原誠司, 栗本文彦, 富永健, 高感度 Hyper Pressure Liquid Chromatography-Radioimmunoassay (HPLC-RIA)による乳癌組織中 Estrone (E1), Estradiol (E2)濃度測定とその臨床的意義. *癌と化学療法*, 24(3), 329–336 (1997).
7. O'Neill J.S., Elton R.A., Miller W.R., Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site. *British Medical Journal*, 296(12), 741–743 (1988).
8. Sasano H., Suzuki T., Nakata T., Moriya T., New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer*, 13(2), 129–136 (2006).
9. Sasano H., Ozaki M., Aromatase expression and its localization in human breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61(3-6), 293–298 (1997).
10. Suzuki T., Nakata T., Miki Y., Kaneko C., Moriya T., Ishida T., Akinaga S., Hirakawa H., Kimura M., Sasano H., Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma. *Cancer Research*, 63, 2762–2770 (2003).
11. Miki Y., Nakata T., Suzuki T., Darnel A.D., Moriya T., Kaneko C., Hidaka K., Shiotsu Y., Kusaka H., Sasano H., Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(12), 5760–5768 (2002).

12. Santner S.J., Feil P.D., Santen R.J., In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: Relative importance versus the aromatase pathway. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 59(1), 29–33 (1984).
13. Purohit A., Hejaz H.A.M., Woo L.W.L., van Strien A.E., Potter B.V.L., Reed M.J., Recent advances in the development of steroid sulphatase inhibitors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 227–238 (1999).
14. Purohit A., Froome V.A., Wang D.Y., Potter B.V.L., Reed M.J., Measurement of oestrone sulphatase activity in white blood cells to monitor in vivo inhibition of steroid sulphatase activity by oestrone-3-*O*-sulphamate. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 62(1), 45–51 (1997).
15. Purohit A., Williams G.J., Roberts C.J., Potter B.V.L., Reed M.J., In vivo inhibition of oestrone sulphatase and dehydroepiandrosterone sulphatase by oestrone-3-*O*-sulphamate. *International Journal of Cancer*, 63(1), 106–111 (1995).
16. Purohit A., Woo L.W.L., Potter B.V.L., Reed M.J., In vivo inhibition of estrone sulfatase activity and growth of Nitrosomethylurea-induced mammary tumors by 667 COUMATE. *Cancer Research*, 60, 3394–3396 (2000).
17. Purohit A., Woo L.W.L., Singh A., Winterborn C.J., Potter B.V.L., Reed M.J., In vivo activity of 4-methylcoumarin-7-*O*-sulfamate, a nonsteroidal, nonestrogenic steroid sulfatase inhibitor. *Cancer Research*, 56, 4950–4955 (1996).
18. Stanway S.J., Purohit A., Woo L.W.L., Sufi S., Vigushin D., Ward R., Wilson R.H., Stanczyk F.Z., Dobbs N., Kulinskaya E., Elliott M., Potter B.V.L., Reed M.J. and Coombes R.C., Phase I study of STX 64 (667 coumate) in breast cancer patients: the first study of a steroid sulfatase inhibitor. *Clinical Cancer Research*, 12(5), 1585–1592 (2006).
19. McNamara K.M., Nakamura Y., Miki Y., Sasano H., Phase two steroid metabolism and its roles in breast and prostate cancer patients. *Frontiers in Endocrinology*, 4, Article 116, 1–7 (2013).
20. Williams S.J., Sulfatase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(1), 79–98 (2013).
21. Ishida H., Nakata T., Sato N., Li P.K., Kuwabara T., Akinaga S., Inhibition of steroid sulfatase activity and cell proliferation in ZR-75-1 and BT-474 human breast cancer cells by KW-2581 in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, 104(2), 211–219 (2007).
22. Ishida H., Nakata T., Suzuki M., Shiotsu Y., Tanaka H., Sato N., Terasaki Y., Takebayashi M., Anazawa H., Murakata C., Li P.K., Kuwabara T., Akinaga S., A novel steroidal selective steroid sulfatase inhibitor KW-2581 inhibits sulfated-estrogen dependent growth of breast cancer cells in vitro and in animal models. *Breast Cancer Research and Treatment*, 106(2), 215–227 (2007).

23. Serajuddin A.T.M., Salt formation to improve drug solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 603–616 (2007).
24. McNamara D.P., Childs S.L., Giordano J., Iarriccio A., Cassidy J., Shet M.S., Mannion R., O'Donnell E., Park A., Use of a glutaric acid cocrystal to improve oral bioavailability of a low solubility API. *Pharmaceutical Research*, 23(8), 1888–1897 (2006).
25. Blagden N., de Matas M., Gavan P.T., York P., Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 617–630 (2007).
26. Brough C., Williams III R.O., Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 157–166 (2013).
27. Vo C.L., Park C., Lee B.J., Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 799–813 (2013).
28. Carrier R.L., Miller L.A., Ahmed I., The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, 123(2), 78–99 (2007).
29. Clas S.D., Sanchez R.I., Nofsinger R., Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges. *Drug Discovery Today*, 19(1), 79–87 (2014).
30. Kohli K., Chopra S., Dhar D., Arora S., Khar R.K., Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discovery Today*, 15(21-22), 958–965 (2010).
31. Chaumeil J.C., Micronization: a method of improving the bioavailability of poorly soluble drugs. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 20(3), 211–215 (1998).
32. Vogt M., Kunath K., Dressman J.B., Dissolution enhancement of fenofibrate by micronization, cogrinding and spray-drying: comparison with commercial preparations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(2), 283–288 (2008).
33. 仲井由宣, 山本恵司, 固体医薬品の分子状態に与えるメカノケミカル効果. *表面*, 25(6), 382–393 (1987).
34. 山本恵司, 固体医薬品の分子状態におよぼすメカノケミカル効果. *Pharm Tech Japan*, 12(6), 859–863 (1996).
35. Qiu Z., Stowell J.G., Cao W., Morris K.R., Byrn S.R., Carvajal M.T., Effect of milling and compression on the solid-state Maillard reaction. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(11), 2568–2580 (2005).
36. Willart J.F., Lefebvre J., Danède F., Comini S., Looten P., Descamps M., Polymorphic transformation of the  $\Gamma$ -form of D-sorbitol upon milling: structural and nanostructural analyses. *Solid State Communications*, 135(8), 519–524 (2005).

37. Ward G.H., Schultz R.K., Process-induced crystallinity changes in albuterol sulfate and its effect on powder physical stability. *Pharmaceutical Research*, 12(5), 773–779 (1995).
38. Crowley K.J., Zografi G., Cryogenic grinding of indomethacin polymorphs and solvates: assessment of amorphous phase formation and amorphous phase physical stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(2), 492–507 (2002).
39. Feeley J.C., York P., Sumbly B.S., Dicks H., Determination of surface properties and flow characteristics of salbutamol sulphate, before and after micronisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 172(1–2), 89–96 (1998).
40. Yu L., Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(1), 27–42 (2001).
41. Sarfaraz K.N., *Handbook of Preformulation: Chemical, Biological, and Botanical Drugs*. Informa Healthcare USA, Inc., 212 (2006).
42. Ohta M., Tozuka Y., Oguchi T., Yamamoto K., Water vapor adsorption properties of amorphous cefditoren pivoxil evaluated by adsorption isotherms and microcalorimetry. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(6), 643–649 (2000).
43. Lips A.G.A.M., Lameijer W., Fokkens R.H., Nibbering N.M.M., Methodology for the development of a drug library based upon collision-induced fragmentation for the identification of toxicologically relevant drugs in plasma samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 759(2), 191–207 (2001).
44. Corey E.J., Suggs J.W., Pyridiniumchlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters*, 16(31), 2647–2650 (1975).
45. Parish E.J., Chitrakorn S. & Wei T.-Y., Pyridinium chlorochromate-mediated allylic and benzylic oxidation. *Synthetic Communications*, 16(11), 1371–1375 (1986).
46. Grant D.M., Cheney B.V., Carbon-13 magnetic resonance. VII. Steric perturbation of the carbon-13 chemical shift. *Journal of the American Chemical Society*, 89(21), 5315–5318 (1967).
47. Heathcock C.H., Mahaim C., Schlecht M.F., Utawanit T., A synthetic approach to the quassinoids. *The Journal of Organic Chemistry*, 49(18), 3264–3274 (1984).
48. Fenton H.J.H., Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899–910 (1894).
49. Harber F., Weiss J., The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 147(861), 332–351 (1934).
50. Pignatello J.J., Dark and photoassisted Fe<sup>3+</sup>-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science & Technology*, 26(5), 944–951 (1992).
51. Peres J.A., de Carvalho L.H., Boaventura R.A., Costa C.A., Characteristics of p-

- hydroxybenzoic acid oxidation using Fenton's reagent. *Journal of Environmental Science and Health*, A39(11–12), 2897–2913 (2004).
52. Cuzzola A, Raffaelli A, Saba A, Salvadori P., Identification and characterization of Fenton oxidation products of surfactants by electrospray mass spectrometry and solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. 3. Polyethoxylated fatty alcohols and nonylphenols. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(14), 1198–1206 (2001).
  53. Walling C., Fenton's reagent revisited. *Accounts of chemical research*, 8(4), 125–131 (1975).
  54. Polizzi M.A., Singhal D., Colvin J., Mechanoradical-induced degradation in a pharmaceutical blend during high-shear processing. *Pharmaceutical Development and Technology*, 13(6), 457–462 (2008).
  55. Kuzuya M, Kondo S, Murase K., A novel single electron transfer in solid-state organic compounds: mechanically-induced reduction of dipyridinium salts. *Journal of physical chemistry*, 97(30), 7800–7802 (1993).
  56. 近藤伸一, 古田陽司, 大北信太郎, 笹井泰志, 荒巻秀樹, 葛谷昌之, ステンレス製容器を用いたメカノケミカル固相反応によるリボフラビンラジカルの生成. *YAKUGAKU ZASSHI*, 124(3), 141–148 (2004).
  57. 葛谷昌之, 近藤伸一, 石川敬章, 古田陽司, 荒巻秀樹, 笹井泰志, 山内行玄, 病院・薬局処方で粉碎される市販製剤からのラジカルの生成. *YAKUGAKU ZASSHI*, 125(4), 389–396 (2005).
  58. Hovorka S.W., Schöneich C., Oxidative degradation of pharmaceuticals: theory, mechanisms and inhibition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(3), 253–269 (2001).
  59. Vonk C.G., Computerization of Ruland's X-ray method for determination of the crystallinity in polymers. *Journal of Applied Crystallography*, 6(2), 148–152 (1973).
  60. Nishibori E, Takata M, Kato K, Sakata M, Kubota Y, Aoyagi S, Kuroiwa Y, Yamakata M, Ikeda N., The large Debye–Scherrer camera installed at SPring-8 BL02B2 for charge density studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 467–468(2), 1045–1048 (2001).
  61. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W., NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675 (2012).
  62. David W.I.F., Shankland K, van de Streek J, Pidcock E, Motherwell W.D.S., Cole J.C., DASH: a program for crystal structure determination from powder diffraction data. *Journal of Applied Crystallography*, 39(6), 910–915 (2006).
  63. Louër D, Boultif A., Powder pattern indexing and the dichotomy algorithm. *Zeitschrift für Kristallographie Supplements*, 2007(26), 191–196 (2007).
  64. Peter G. B., Yuri G. A., 16 Solution of flexible molecular structures by simulated annealing. In *Structure Determination from Powder Diffraction Data*; David W.I.F.,

- Shankland K., McCusker L.B., Baerlocher C., Eds.; Oxford University Press: United Kingdom, 286–306 (2002).
65. 西堀英治, 有機粉末構造解析をはじめよう! (4) 実空間法による構造決定. 日本結晶学会誌, 53(4), 240–248 (2011).
  66. Rietveld H.M., A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *Journal of Applied Crystallography*, 2(2), 65–71 (1969).
  67. Hussain H, Al-Harrasi A, Green I.R., Ahmed I., Abbas G., Rehman N.U., meta-Chloroperbenzoic acid (mCPBA): a versatile reagent in organic synthesis. *RSC Advances*, 4(25), 12882–12917 (2014).

## 関連する研究発表

### 論文

Masashi Aoki, Hikaru Nishimura, Akihiro Mimura, Shoji Kita, Tohru Yasuzawa, Katsuhide Terada

Identification of the Degradation Products of the Steroid Sulfatase Inhibitor KW-2581 in Jet Mill-Micronized Powder

Journal of Pharmaceutical Sciences 102(6):1760-1772 (2013)

### 学会発表

青木匡、西村暁、三村明弘、喜多正次、安澤亨、寺田勝英

Steroid Sulfatase Inhibitor KW-2581 の jet mill 粉碎における分解物の同定

日本薬剤学会第 28 年会、名古屋、2013