



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (ナノメディシン科学)
報告番号	甲第1579号
学位記番号	第321号
氏名	吉村 元靖
授与年月日	平成 29年 3月 23日
学位論文の題名	経口吸収改善を目的とした Cilostazol Cocrystal の調製及びその溶解特性の評価と制御
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 尾関 哲也, 松永 民秀, 出羽 毅久 (名古屋工業大学)

名古屋市立大学学位論文

経口吸収改善を目的とした Cilostazol Cocrystal
の調製及びその溶解特性の評価と制御

2017年 3月

名古屋市立大学大学院薬学研究科

吉村 元靖

本論文は2017年3月に名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 名古屋市立大学大学院薬学研究科 湯浅 博昭 教授

副査 名古屋市立大学大学院薬学研究科 松永 民秀 教授

名古屋市立大学大学院薬学研究科 尾関 哲也 教授

名古屋工業大学 生命・物質工学科 出羽 毅久 教授

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. Yoshimura, M.; Miyake, M.; Kawato, T.; Bando, M.; Toda, M.; Kato, Y.; Fukami, T.; Ozeki, T. Impact of the Dissolution Profile of the Cilostazol Cocrystal with Supersaturation on the Oral Bioavailability. *Cryst. Growth Des.* 2017, 17, 550-557.

本論文の基礎となる研究は、尾関 哲也教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

略語一覧.....	1
第1章 序論.....	3
第2章 ヒドロキシ安息香酸誘導体との CLZ cocrystal の調製とその物理化学的性質の 評価.....	7
第1節 諸言.....	7
第2節 実験試料及び方法.....	9
第1項 実験試料.....	9
第2項 実験方法.....	9
第3節 実験結果及び考察.....	13
第1項 ヒドロキシ安息香酸誘導体を用いた Cocrystal スクリーニング.....	13
第2項 CLZ-4HBA cocrystal の調製法検討と物理化学的性質の評価.....	18
第3項 CLZ cocrystal の結晶構造解析.....	23
第4項 ヒドロキシ安息香酸の配合による CLZ co-amorphous の設計と物理的 安定性への効果.....	29
第4節 小括.....	32
第3章 ヒドロキシ安息香酸誘導体の位置異性体によって構成される CLZ cocrystal の 溶解特性の評価と <i>in vivo</i> 経口吸収性との関係性.....	33
第1節 諸言.....	33
第2節 実験試料及び方法.....	36
第1項 実験試料.....	36
第2項 実験方法.....	36
第3節 実験結果及び考察.....	40
第1項 Slurry 法にて精製された CLZ cocrystal の物理化学的性質の評価.....	40

第2項	溶解度積から算出された平衡溶解度の評価.....	46
第3項	CLZ cocrystal の溶出試験と平衡溶解度との関係性.....	49
第4項	CLZ cocrystal と非晶質固体分散体との溶出性の比較.....	52
第5項	ビーグル犬を用いた CLZ cocrystal の経口吸収性の評価と <i>in vitro</i> 溶出 試験における過飽和との関係性.....	53
第6項	CLZ cocrystal の物理的安定性の評価.....	56
第4節	小括.....	61
第4章	溶解特性の異なる CLZ cocrystal の過飽和制御.....	62
第1節	諸言.....	62
第2節	実験試料及び方法.....	64
第1項	実験試料.....	64
第2項	実験方法.....	64
第3節	実験結果及び考察.....	65
第1項	CLZ cocrystal の微粉砕による溶出性及び経口吸収性への影響.....	65
第2項	CLZ cocrystal の共通イオン効果を利用した過飽和制御.....	69
第3項	CLZ cocrystal の Eutectic point と過飽和及び経口吸収性.....	74
第4節	小括.....	79
第5章	総括.....	81
	謝辞.....	84
	引用文献.....	85
	参考情報.....	91

略語一覽

2HBA:	2-hydroxybenzoic acid
2,4DHBA:	2,4-dihydroxybenzoic acid
2,5DHBA:	2,5-dihydroxybenzoic acid
3HBA:	3-hydroxybenzoic acid
4HBA:	4-hydroxybenzoic acid
ASD	amorphous solid dispersion
AUC_{0-8h}	area under the serum concentration – time curve between 0 hr and 8 hr
BA	bioavailability
BCS	biopharmaceutics classification system
BE	bioequivalence
C_{eu}	eutectic point
C_{max}	maximum drug concentration
C_{tr}	transition point
CLZ	cilostazol
$[CLZ]_{eu}$	eutectic point of cilostazol
$[coformer]_{eu}$	eutectic point of coformer
GRAS	generally recognized as safe
ΔH_m	enthalpy of melting
ΔH_{sol}	enthalpy of solution
JM	jet-milled
K_{11}	the binding constant for the complex formation of drug/coformer in solution
K_{eu}	eutectic constant
K_{sp}	solubility product
LAG	liquid assisted grinding
MRT_{0-8h}	mean residence time between 0 hr and 8 hr
PXRD	powder X-ray diffraction
S_{CC}	solubility of cilostazol cocrystal
$S_{CC-2,4DHBA}$	solubility of cilostazol/2,4-dihydroxybenzoic acid cocrystal

$S_{CC-2,5DHBA}$	solubility of cilostazol/2,5-dihydroxybenzoic acid cocrystal
$S_{CC-4HBA}$	solubility of cilostazol/4-hydroxybenzoic acid cocrystal
S_{drug}	solubility of cilostazol
SGF	simulated gastric fluid
t_{max}	maximum drug concentration time
T_g	glass temperature
XRD	X-ray diffraction

第1章 序論

近年の医薬品開発では、高い薬理効果の発現を目的として活性化合物の骨格に疎水性置換基を導入する傾向にあり、それに伴い難溶解性化合物の割合が増加している。また、薬理効果の発現には生物学的利用能（Bioavailability, 以下 BA と示す）を最大限確保することが重要であり、それ故に薬物の溶解性と膜透過性の把握は医薬品開発において欠かせないものとなっている。その指標として Figure 1-1 に示す Biopharmaceutics Classification System (BCS) が提案されており¹⁾、溶解性と膜透過性によって薬物を分類する BCS は、創薬における化合物の評価基準として活用されるだけでなく、2000年には FDA ガイダンスにて BA/BE 試験における biowaiver の指標としても広く活用されている²⁾。2010年に発表された論文によると、近年の難溶解性化合物の増加を象徴するように、上市された製品の約40%、及び R&D パイプラインにおける実に80~90%が BCS Class II または IV の化合物と報告されている (Table 1-1)³⁾。

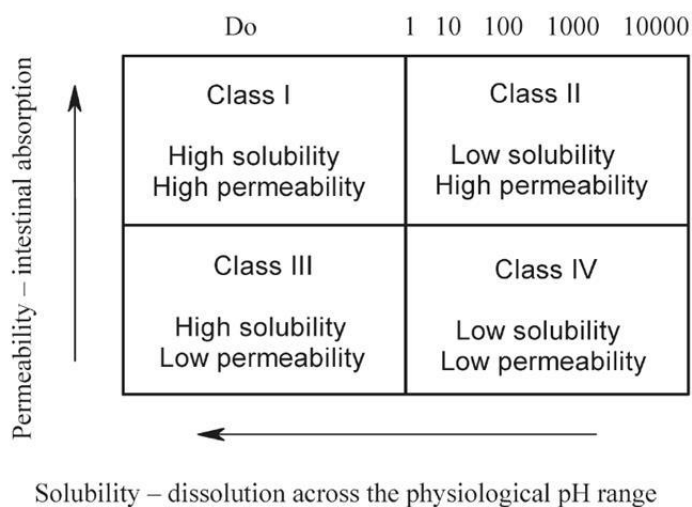


Figure 1-1. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) of drugs according to intestinal absorption and oral administration parameters. High/Low solubility is defined with reference to the Dose number, Do, which is the ratio of the highest drug strength in the administered volume (taken as 250 mL = a glass of water).⁴⁾

Table 1-1. Low solubility drugs in the market and in the R&D pipeline according to the Biopharmaceutics Classification System (BCS) ³⁾

BCS class	solubility	permeability	% drugs on market	% drugs in R&D pipeline
I	high	high	35	5-10
II	low	high	30	60-70
III	high	low	25	5-10
IV	low	low	10	10-20

難溶解性化合物の増加に伴い、その溶解改善に関する研究が注目されるようになり、原薬の微粉碎、非晶質固体分散体、塩、Cocrystal のような製剤的手法が活発に研究されてきた。それぞれの溶解改善手法は化合物の物理化学的性質に応じて適切なものを選択することが重要であり、脂溶性の高い化合物では Lipid-based formulation として設計することで経口吸収性を大幅に改善させた事例や⁵⁻⁷⁾、解離基の伴う化合物の場合には塩として設計することで高い吸収性を示す事例も報告されている⁸⁻¹⁰⁾。また、中でも非晶質固体分散体は高い溶解改善効果とそれに伴う経口吸収性を示す事例が多く報告されており¹¹⁻¹³⁾、難水溶性化合物の溶解改善手法として広く活用されてきた。一方で、非晶質状態における熱力学的エネルギー状態は高く、物理化学的な安定性に懸念があることも知られている¹³⁻¹⁵⁾。対して、塩や Cocrystal のような結晶原体は物理化学的に安定であるケースが多く⁴⁾、特に解離基の有無に関わらず幅広い種類の Coformer によって選定される Cocrystal は非常に有用であることから、2000 年代から難溶解性化合物の Cocrystal 研究が加速すると同時に、溶解性や経口吸収性の改善に成功した事例も多数報告されている^{10,11,16-19)}。

Cocrystal は複数の成分から構成される分子結晶のことであり、特に医薬品の Cocrystal では、原薬 (API) 及び添加剤からなる複合体結晶を指すことが多い。Figure 1-2 には複数成分を含む分子結晶の概略を示すが、広義な意味では(f)に示す Cocrystal の他に、(c)や(d)に示す溶媒和物 (hydrate/solvate)、及び(e)に示す塩 (salt) も包括される。Cocrystal の構成成分の中で、活性成分となる医薬品化合物以外の分子は、Coformer, Cocrystal former, または Guest と呼ばれ、構成分子間の相互作用の中にイオン結合が存

在しない分子結晶を Cocrystal として定義している²⁰⁾。この定義によると、水和物 (hydrate) や溶媒和物 (solvate) も Cocrystal に属することになるが、一方では分子結晶を構成する分子が常温で固体のものに限定することを Cocrystal の定義として提唱する論文も報告されている²¹⁾。

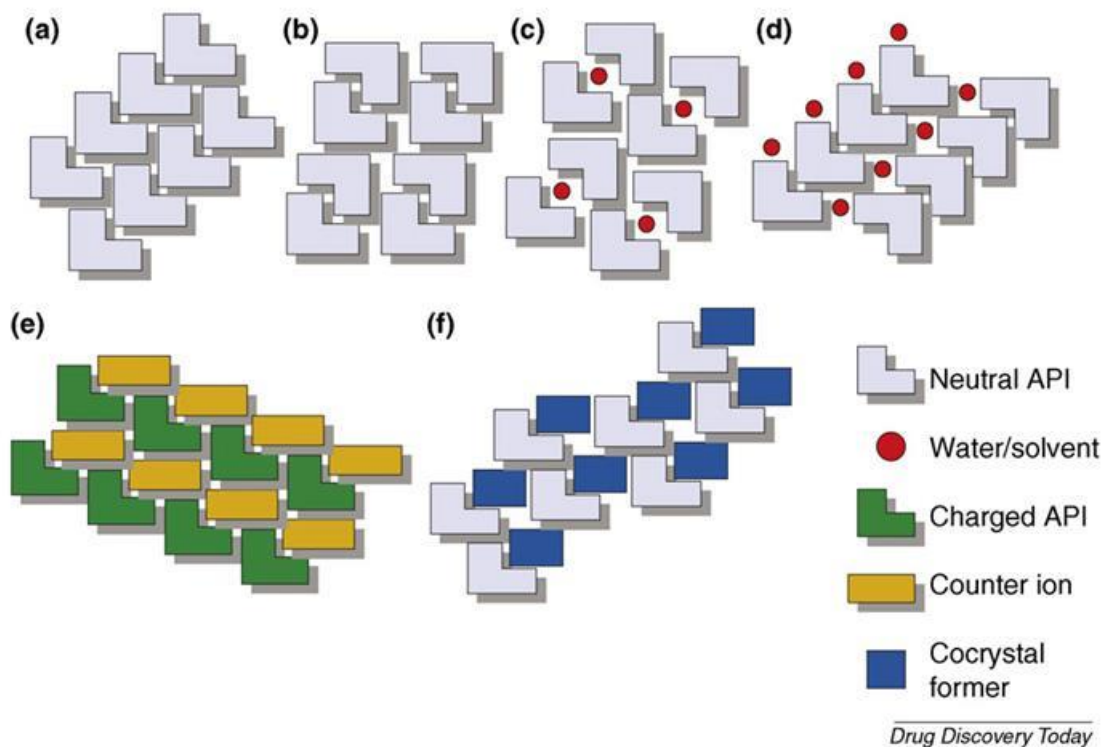


Figure 1-2. The range of single crystalline forms that are possible for an API: (a) pure API; (b) polymorph of pure API; (c) clathrate hydrate/solvate of API; (d) hydrate/solvate of API; (e) salt of API; (f) pharmaceutical cocrystal. Salts and cocrystals can also form hydrates, solvates, and polymorphs.²¹⁾

大塚製薬株式会社で創薬された Cilostazol (製品名 プレターール, 以下 CLZ と示す) は血管拡張作用を伴う抗血小板薬として開発された化合物であり²²⁾, Figure 1-3 に示すように分子構造に解離基を持たない BCS Class II の化合物である²³⁾。Bramer らの報告によると, 50 mg 錠をヒトに投薬した際の CLZ の血漿中濃度プロファイルの曲線下面積 (AUC) はエタノール溶液に対して 13%と報告されており²⁴⁾, 低い水溶解性が経口吸収の弊害となっていることが示唆される。CLZ は 1980 年代に単一の分子結晶として開発されているが, CLZ の化学構造の中にテトラゾールやカルボスチリルといった水素結合が期待される骨格を含むため, Cocrystal の精製による経口吸収の改善を期待して研究を開始した。

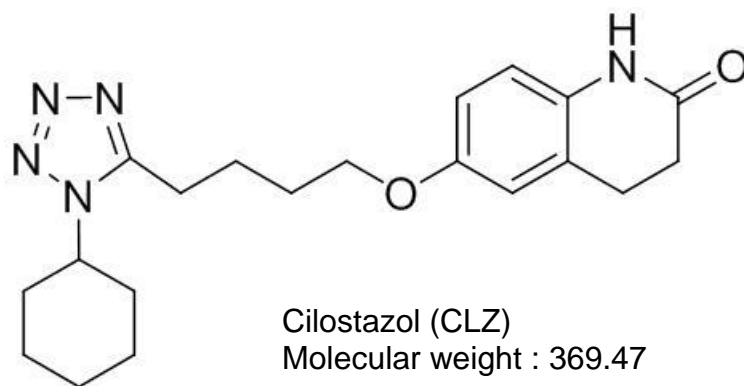


Figure 1-3. Chemical structure of CLZ.

本研究の目的は, 難溶解性薬物である CLZ の Cocrystal 化による経口吸収性の改善とした上で, 第 2 章ではスクリーニング検討より精製が確認されたヒドロキシ安息香酸誘導体との Cocrystal 調製方法及びその物理化学的性質の評価, 第 3 章ではヒドロキシ安息香酸誘導体の位置異性体により構成される CLZ cocrystal の溶解特性の評価と *in vivo* 経口吸収性との関係性を論じる。第 4 章では第 3 章にて明らかとなった溶解特性の異なる CLZ cocrystal の溶解速度と過飽和との関係性を評価すると共に, 過飽和制御を目的とした研究に関して報告する。

第2章 ヒドロキシ安息香酸誘導体との CLZ cocrystal の調製とその物理化学的性質の評価

第1節 諸言

Cocrystal の調製法には Evaporation 法^{25,26)}, Slurry 法^{26,27)}, Grinding 法²⁸⁻³⁰⁾, 及び Melt 法^{16,31)}など、過去にもいくつか報告されているが、探索スクリーニングにおけるスループット、更には工業化における精製プロセス、スケールアップ効率等を想定すると、Slurry 法が最も広く汎用されている。

Slurry 法は薬物と Cocrystal との溶解度差を利用して精製させる手法であり、結晶化溶媒中での薬物及び Coformer の溶解度と、精製される共晶物の溶解度との関係性を把握することが重要となる。それ故に、特に探索スクリーニング段階のような一律の条件で精製検討を行う場合には、精製条件を満たしていないが故に Cocrystal が精製されない可能性も考えられ得る。

Grinding 法は固体間反応によって共晶物を生成させる手法であるが、その生成メカニズムには、Grinding の衝撃による分子拡散、共晶物生成、非晶質状態を経由した Cocrystallization などのプロセスを含んでいる³⁰⁾。比較的古典的な手法であるものの、過去には Piroxicam と数種の Carboxylic acid との Cocrystal 検討において、溶媒法では確認されなかった Cocrystal が Grinding 法にて確認された事例もされている²⁵⁾。近年では、Grinding 法のようなメカノケミカル的な手法と Slurry 法に代表されるような溶媒媒介結晶転移を組み合わせた Liquid Assisted Grinding 法（以下 LAG と示す）も報告されており^{28,29,32)}、少量の溶媒を触媒として添加することで分子拡散後の共晶化を効率的に促す手法として注目されている。LAG 法は対象となる Coformer を溶媒に溶解させる必要がないこと（共晶点と溶解度との関係性を気にする必要がない）、Cocrystal 形成に重要な Solute…Solute 相互作用を妨害する Solute…Solvent 相互作用が制限されることなどから、幅広い Coformer で Cocrystal 形成が期待できる³³⁾。実際に、Slurry 法では確認されなかった Cocrystal の多形も LAG 法にて認められた事例もあり²⁹⁾、特に探索段階ではこれらの精製手法を複合的に活用することが重要であると考えられる。

CLZ では、過去にカルボン酸、糖類、アミノ酸など 61 種の Coformer 候補と Cocrystal 探索スクリーニングを Slurry 法で実施した経緯があり、その中で 4-Hydroxybenzoic acid

との組合せで Cocrystal が確認された実績がある³⁴⁾。このようなヒドロキシ安息香酸は過去にも Caffeine との Cocrystal 形成が確認されており、水酸基の置換位置によって異なる結晶パッキングを有することも報告されている³⁵⁾。ヒドロキシ安息香酸は Cocrystal 形成に必要ないくつかの水素結合エージェントを有していると共に、比較的強固な芳香環相互作用 ($\pi \cdots \pi$ 相互作用) も期待できる³⁶⁾。本章では Figure 2-1 に示す安息香酸またはヒドロキシ安息香酸誘導体を対象として Cocrystal 調製検討を実施すると共に、そこで得られる CLZ cocrystal の物理化学的性質及び結晶構造の評価を試みた。

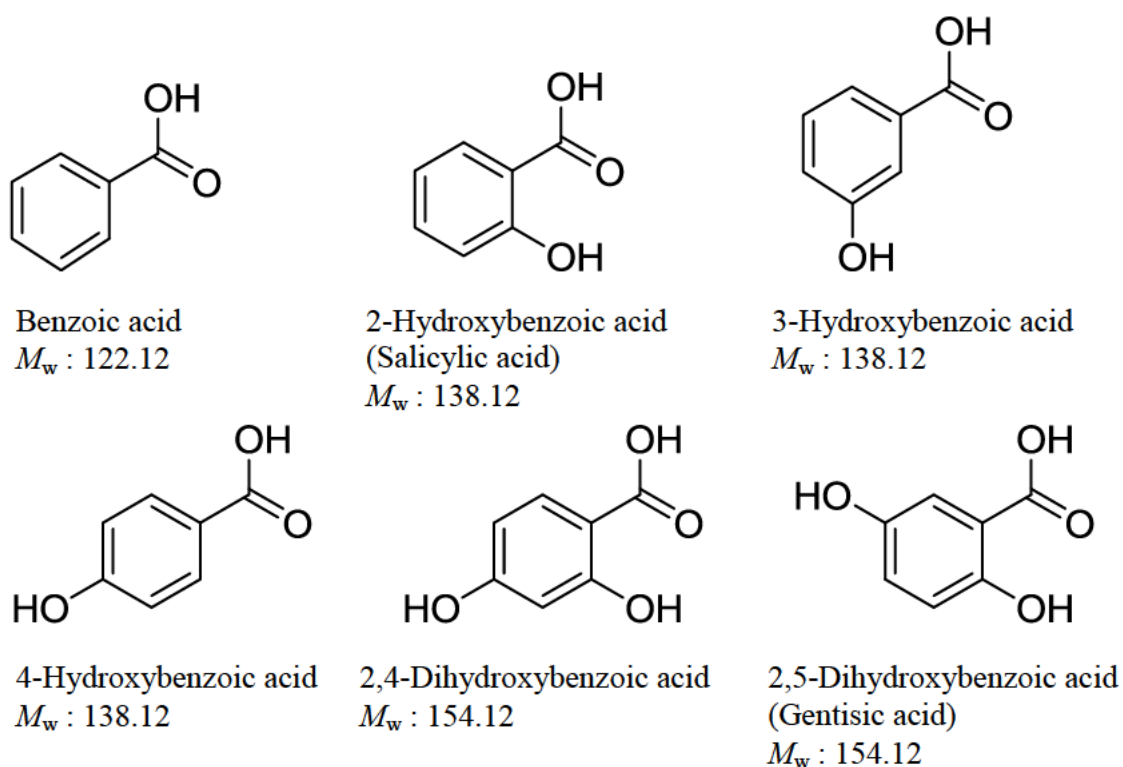


Figure 2-1. Chemical structures of benzoic acid and hydroxybenzoic acid derivatives.

第2節 実験試料及び方法

第1項 実験試料

CLZは大塚製薬株式会社（徳島）にて合成・粉碎されたハンマーミル処理原末を使用した。Coformerの候補として使用した、安息香酸またはヒドロキシ安息香酸誘導体のうち、Benzoic acid, 4-Hydroxybenzoic acid (以下4HBAと示す), 2,4-Dihydroxybenzoic acid (以下2,4DHBAと示す), 2-5-Dihydroxybenzoic acid (別名Gentisic acid, 以下2,5DHBAと示す)は和光純薬工業株式会社（大阪）の特級試薬を、2-Hydroxybenzoic acid (別名Salicylic acid, 以下2HBAと示す)は関東化学株式会社（東京）の試薬グレードを、及び3-Hydroxybenzoic acid (以下3HBAと示す)はナカライテスク株式会社（京都）の試薬グレードを使用した。非晶質固体分散体の設計で使用したHypromellose (type 2910, grade TC-5E)は信越工業株式会社（東京）から提供された。その他の試薬は和光純薬工業株式会社（大阪）の試薬グレードを使用した。

第2項 実験方法

1. LAG法によるCLZ cocrystalの調製検討

Figure 2-2に示す調製フローに従って検討した。ステンレスジャーに400 mgのCLZを秤取し、CLZに対して化学量論比で1:1となるように秤量したCoformerを加え、直径10 mmのステンレスボールを投入して30秒間軽く振り混ぜた。混合後、99.5%エタノールを50 µL加え、Retsch社（Germany）のミキサーミルMM 2000を用いて25 Hzの振とう数で60分間粉碎処理を実施した。得られた粉碎末は40 °Cで12 hr真空乾燥した。

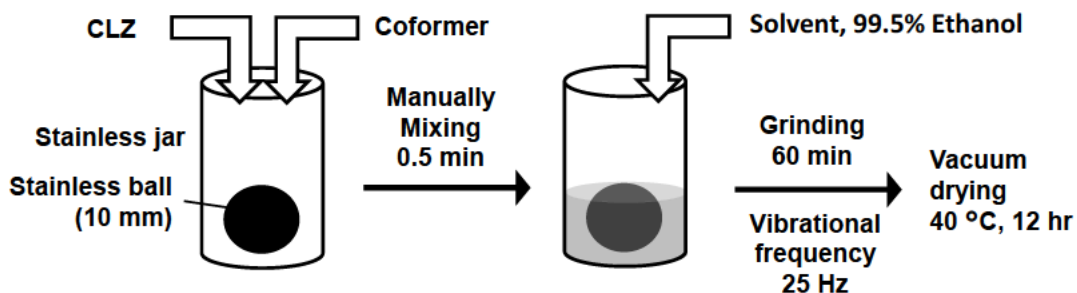


Figure 2-2. The preparation flow of the CLZ cocrystals by Liquid Assisted Grinding (LAG) method.

2. Slurry 法による CLZ cocrystal の調製検討

Figure 2-3 に示す調製フローに従って検討した。Slurry 法では Cocrystal の精製を加速させるために添加する Coformer を増量した。50 mL のガラス製遠沈管に 4.0 g の CLZ を秤取し、CLZ に対して化学量論比で 1:2 となるように秤量した Coformer を加えて、99.5%エタノールまたはアセトンを 40 mL 添加して懸濁分散し、振とう攪拌しながら 7 日間室温で処理を継続した。得られた懸濁液は吸引濾過して残渣を回収し、40 °C で 12 hr 真空乾燥した。

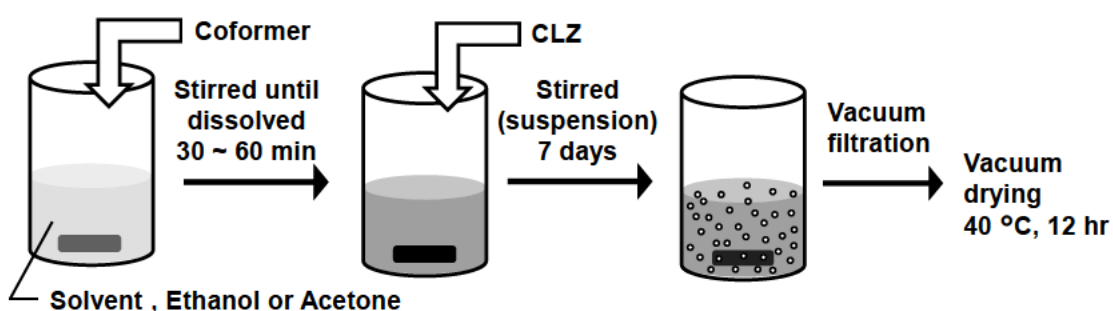


Figure 2-3. The preparation flow of the CLZ cocrystals by Slurry method.

3. Spray-Drying 法による CLZ-4HBA cocrystal 及び非晶質固体分散体の調製

Spray-Drying 法に使用する溶媒はジクロロメタンと 99.5%エタノールを体積比 80:20 で混合した調製溶媒を使用した。Table 2-1 に示す各種組成で調製溶媒に攪拌溶解し、スプレードライヤー GB-22 (ヤマト科学株式会社, 東京) を用いて, 給気温度 80 °C, 給気風量 0.40~0.45 m³/hr, 送液速度 10 g/min の条件で噴霧乾燥した。得られた噴霧乾燥末は 40 °C で 12 hr 真空乾燥して回収した。

Table 2-1. The formulas of CLZ cocrystal and amorphous solid dispersion prepared by spray-drying

SD formula	CLZSD-01	CLZSD-02	CLZSD-03
CLZ	5.0 g	5.0 g	5.0 g
4HBA	1.9 g	---	1.9 g
Hypromellose, TC-5E	---	10.0 g	10.0 g
CH ₂ Cl ₂ / EtOH (80:20, v/v) mixed solvent	200 mL	200 mL	200 mL

4. Powder X-ray Diffraction (PXRD)

PANalytical 社 (The Netherlands) の X' Pert PRO MPD にてチューブ電圧及び電流条件を 45 kV 及び 40 mA にそれぞれ設定して分析した。測定は 2θ として 3° から 40° の範囲で, 0.04° の step サイズで 1.905 step/s の速度で実施した。

5. 熱力学的特性の評価

TA Instruments 社 (Newcastle, DE) の DSC Q2000 にて, 3-6 mg の試験サンプルを蓋付きアルミニウムパンに秤取し, クリンプした状態で 50 mL/min の速度で窒素パージした条件下で 5 °C/min の昇温速度で分析した。

6. ラマン分析

Kaiser Optical Systems 社 (Ann Arbor, MI) のレーザー波長 785 nm の MR-Probe-785 が装備された Raman WorkStation-785 にて試験サンプルを評価した。

7. 電子顕微鏡 (SEM)

株式会社キーエンス(大阪)の電子顕微鏡 VE-7800 を用いて試料の外観を観察した。

8. CLZ cocrystal single cocrystal の調製

結晶構造解析のための Single crystal の調製は, Cocrystal に応じて下記に示す各々適切な条件で精製した。CLZ-4HBA single cocrystal は, 100 mg の CLZ 及び 374 mg の 4HBA (CLZ に対して化学量論比で 1:10) を 20 mL のアセトンに溶解し, 0.22 μm のシリンジフィルターで濾過して室温で静置した。CLZ-2,4DHBA single cocrystal は, 100 mg の CLZ 及び 834 mg の 2,4DHBA (CLZ に対して化学量論比で 1:20) を 20 mL のアセトンに溶解し, 0.22 μm のシリンジフィルターで濾過して室温で静置した。CLZ-2,5DHBA single cocrystal は, 4.0 g の CLZ と 16.7 g の 2,5DHBA (CLZ に対して化学量論比で 1:10) を 20 mL のアセトンに添加し, 70 $^{\circ}\text{C}$ まで加熱して過飽和濃度まで溶解し (未溶解分を含む), 室温まで放冷して 0.22 μm のシリンジフィルターで濾過して 30~40 $^{\circ}\text{C}$ で静置した。CLZ-3HBA single cocrystal は, 1.0 g の CLZ と 7.5 g の 3HBA (CLZ に対して化学量論比で 1:20) を 20 mL のメタノールに添加し, 70 $^{\circ}\text{C}$ まで加熱して過飽和濃度まで溶解し (未溶解分を含む), 室温まで放冷して 0.22 μm のシリンジフィルターで濾過した後に室温で静置した。いずれの調製条件でも 1~2 mm 程度の Single crystal が精製されるまで放置した。

9. Single-crystal X-ray Diffraction

株式会社リガク (東京) の RAXIS RAPID diffractometer を用いて, RAPID-AUTO で測定を実施した。得られたデータは Direct method (SHELXT³⁷⁾) とフーリエ法に基づいて結晶構造を解析し, 更に全ての結晶構造解析パラメータは CrystalStructure crystallographic software package と SHELXL³⁸⁾によって算出した。

第3節 実験結果及び考察

第1項 ヒドロキシ安息香酸誘導体を用いた Cocrystal スクリーニング

LAG 法及び Slurry 法により CLZ cocrystal の調製検討を実施し、得られた回収物の PXRD パターンを評価した結果を Table 2-2 に示す。LAG 法にて調製された6種のうち、Benzoic acid または 2HBA と処理した Complex は CLZ 固有の PXRD ピークを示し、3HBA, 4HBA, 2,4DHBA, 及び 2,5DHBA と処理した Complex は CLZ 及び Coformer 由来とも異なる PXRD パターンの変化が確認された (Figure 2-4)。対して、Slurry 法では 99.5% エタノール及びアセトン溶媒中にて精製を試みたところ、4HBA 及び 2,4DHBA では溶媒種によらず PXRD パターンの変化が認められた。3HBA 及び 2,5DHBA では LAG 法で認められた PXRD パターン変化は認められず、CLZ のままであることが確認された。Slurry 法による 3HBA との調製検討でも一部 CLZ 由来の PXRD パターンが認められており、LAG 法の方が CLZ cocrystal をより幅広く探索できる可能性が示唆された。

Table 2-2. PXRD pattern of CLZ/coformer substances

Coformer	LAG method	Slurry in Ethanol	Slurry in Acetone
Benzoic acid	Drug + Coformer	Drug	Drug
2HBA	Drug + Coformer	Drug	Drug
3HBA	PXRD pattern changed	Drug	Drug
4HBA	PXRD pattern changed	PXRD pattern changed	PXRD pattern changed
2,4DHBA	PXRD pattern changed	PXRD pattern changed	PXRD pattern changed
2,5DHBA	PXRD pattern changed	Drug	Drug

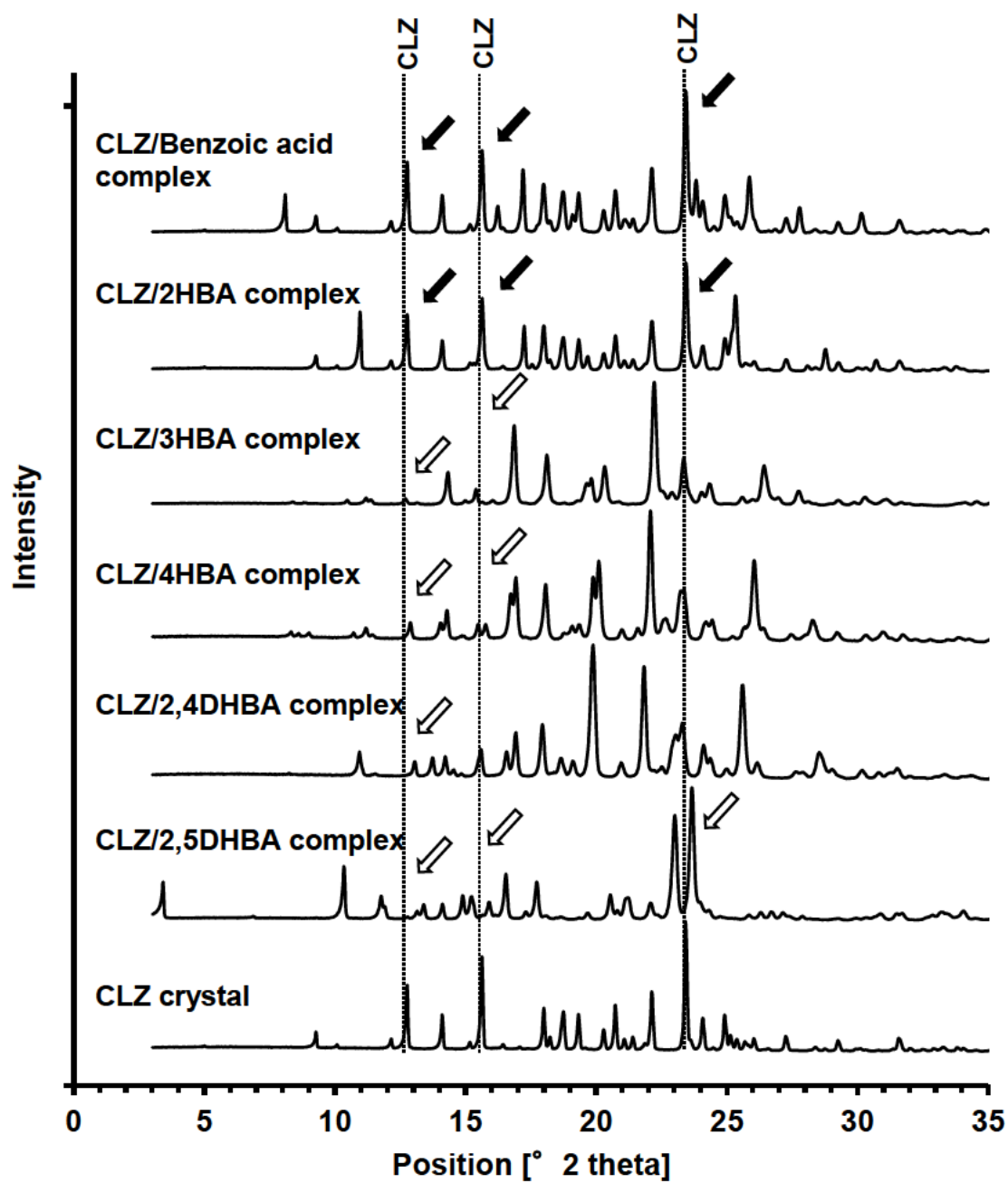


Figure 2-4. The PXRD patterns of CLZ/coformer complexes prepared by LAG method. The closed arrows indicate the specific peaks of CLZ crystal. The open arrows indicate that the PXRD peaks don't correspond to those of CLZ crystal.

LAG 法にて PXRD パターン変化が認められた生成物 (Cocrystal と推定) を対象に熱力学的特性を評価し, Figure 2-5 に DSC チャート, Table 2-3 に融点 (Melting point) 及び融解熱量 (Enthalpy of melting, ΔH_m) を示す。CLZ-4HBA cocrystal では融点が CLZ とほぼ同程度の 161.5 °C であったのに対し, CLZ-2,4DHBA cocrystal では 152.6 °C, CLZ-3HBA cocrystal 及び CLZ-2,5DHBA cocrystal ではそれぞれ 132.2 °C, 120.1 °C と低い値を示した。各種 Cocrystal は仕込み量通り, CLZ と Coformer とが化学量論比 1:1 で構成されていると仮定し, 融解熱量 (J/mol) は過去の報告を参考に³⁹⁾, Cocrystal のモル量を構成成分 2 mol 相当として換算した。CLZ-3HBA cocrystal と CLZ-2,5DHBA cocrystal はそれぞれ 32.2 J/mol, 29.3 J/mol と CLZ の 51.0 J/mol と比較して顕著に低い値を示した。CLZ-4HBA cocrystal 及び CLZ-2,4DHBA cocrystal でもそれぞれ 36.5 J/mol, 34.4 J/mol と比較的 low, 相転移に必要なエネルギーは CLZ よりも低いことが示唆された。

Figure 2-6 には LAG 法にて PXRD パターンの変化が認められた生成物の SEM 写真を示す。20 μm 程度のハンマーミル処理 CLZ が, LAG によっていずれも数 μm 程度にまで粉砕が進行していることが確認された。

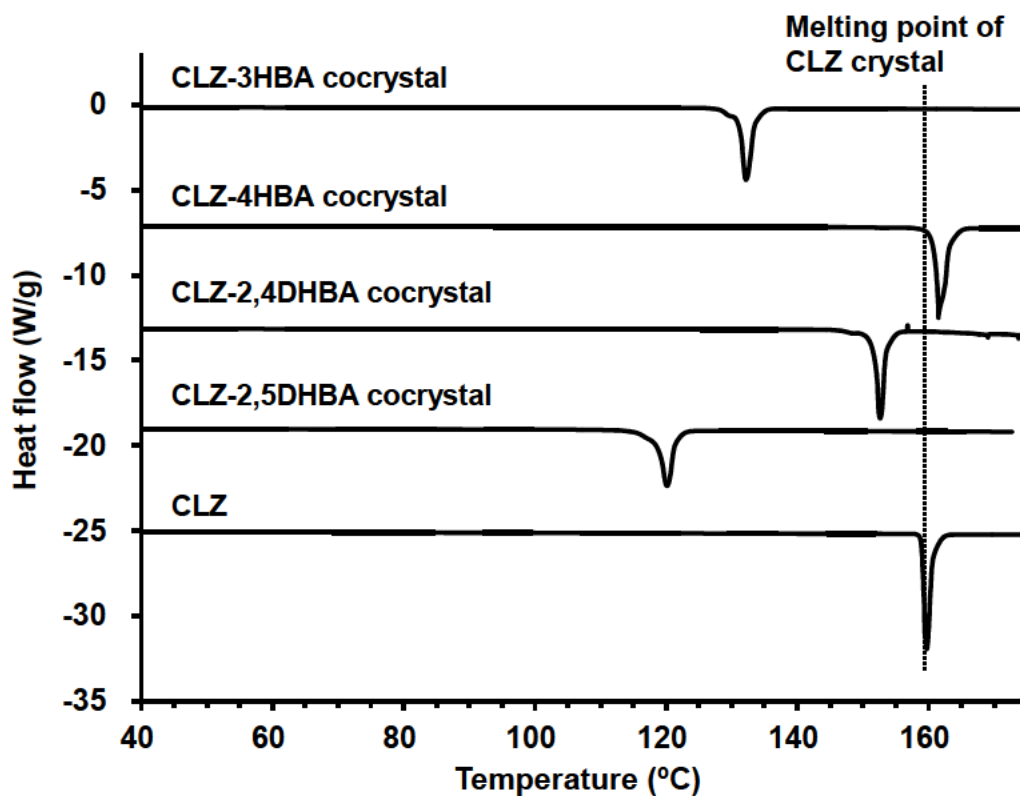


Figure 2-5. The DSC curves of CLZ crystal and cococrystals prepared by LAG. The dashed line indicates the melting point of CLZ crystal (159.7 °C).

Table 2-3. Melting points and enthalpy values for CLZ crystal and cococrystals prepared by LAG

Substance	CLZ -3HBA cococrystal (LAG)	CLZ -4HBA cococrystal (LAG)	CLZ -2,4DHBA cococrystal (LAG)	CLZ -2,5DHBA cococrystal (LAG)	CLZ crystal
Melting point (°C)	132.2	161.5	152.6	120.1	159.7
Enthalpy of melting ΔH_m (kJ/mol) ^a	32.2	36.5	34.4	29.3	51.0

^a The enthalpy of melting for cococrystals is normalized by moles of component molecules (drug + coformer) per mole of cococrystal.

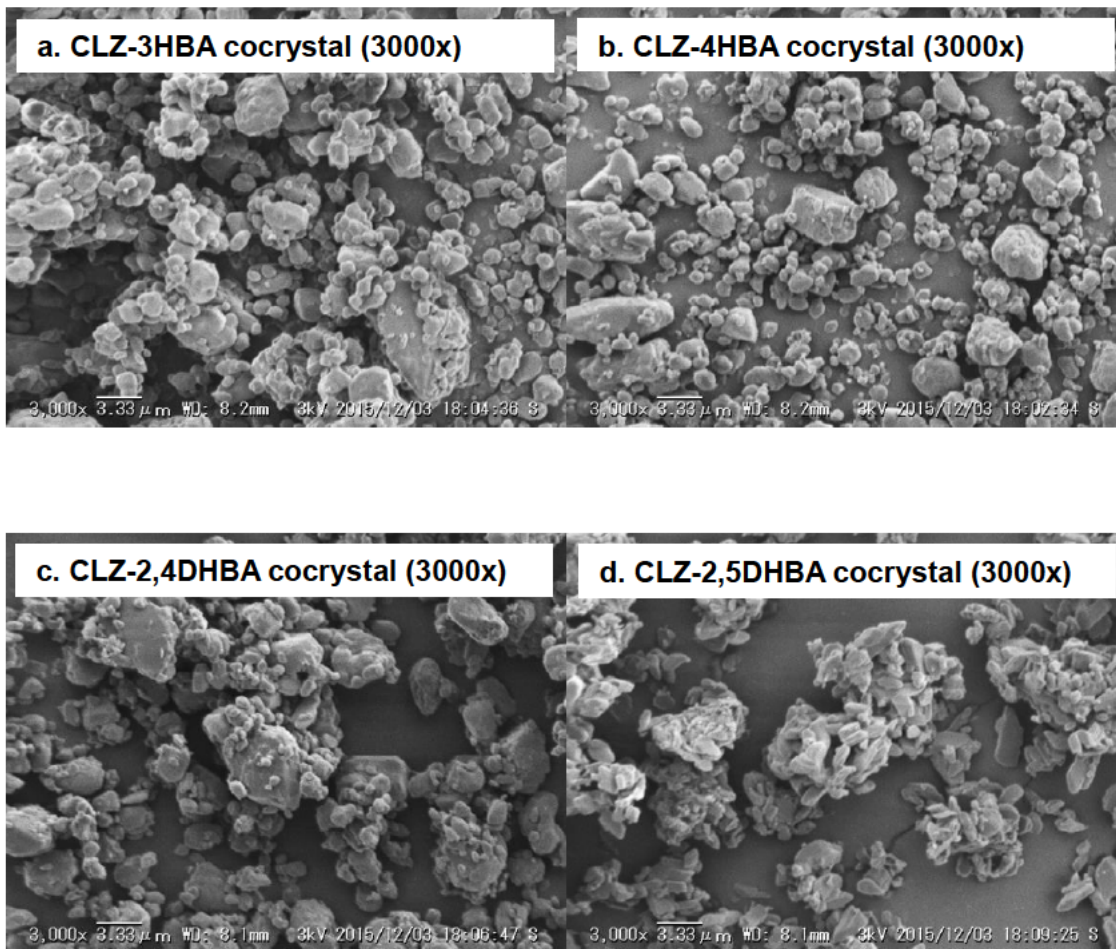


Figure 2-6. SEM images of CLZ cocrystals prepared by LAG method and CLZ hammer-milled. (a) represents CLZ-3HBA cocrystal, (b) represents CLZ-4HBA cocrystal, (c) represents CLZ-2,4DHBA cocrystal, and (d) represents CLZ-2,5DHBA cocrystal.

第2項 CLZ-4HBA cocrystal の調製法検討と物理化学的性質の評価

PXRD パターンの変化が認められた CLZ-4HBA cocrystal において、LAG 法、Slurry 法による生成物に加えて、溶媒を添加しない Dry grinding 法及び Spray-Drying 法による生成物との PXRD パターンの比較を Figure 2-7 に示す。Slurry 法及び LAG 法では Cocrystal 由来と推定される 20° 付近の PXRD ピークが確認された。Dry grinding 法では粉砕の進行に伴い結晶構造が破壊され、16° 及び 23° 付近の CLZ 由来のピークを示しつつも、非晶質化の進行による PXRD パターンのハロー化が確認された。Spray-Drying 法による噴霧乾燥末では処理直後では非晶質化に伴うハローパターンが確認され、40 °C 真空乾燥後には Cocrystal 由来と推測される PXRD パターンにシフトする傾向が確認された。

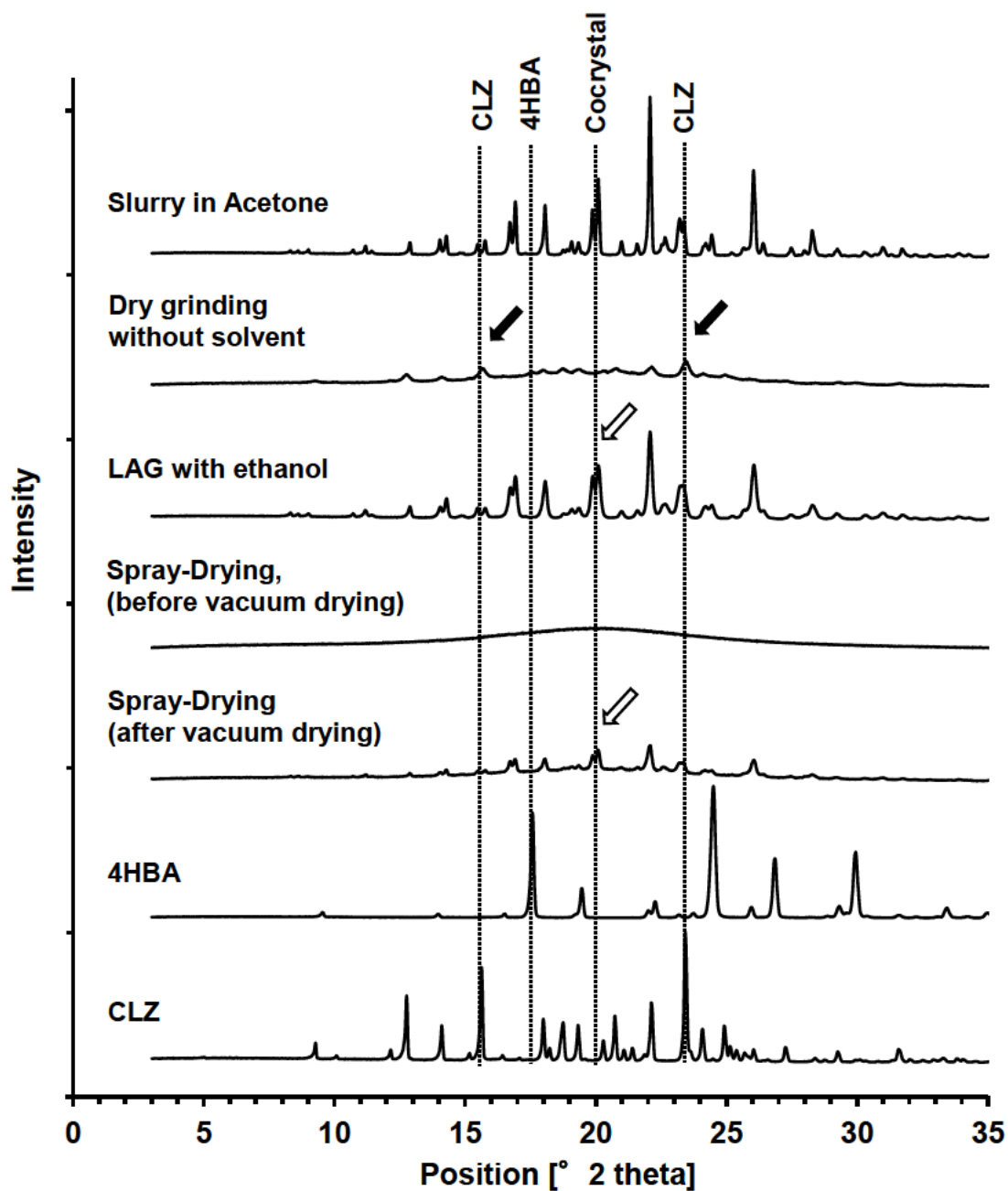


Figure 2-7. PXRD patterns of CLZ-4HBA cocrystals or CLZ/4HBA complexes. The open arrows indicate the specific PXRD peak of CLZ-4HBA cocrystal (around 20°), and the closed arrows indicate the specific PXRD peaks of CLZ crystal (around 16° and 23°).

Figure 2-8 には Slurry 法, LAG 法, 及び Spray-Drying 法にて調製した CLZ-4HBA cocrystal のラマン分析結果を示す。いずれも Cocrystal を示唆するラマンシフトが確認されると共に, 1250 cm^{-1} 付近の CLZ 由来の特徴的なピークが減弱することが確認された。LAG 法及び Spray-Drying 法ではほとんど類似のラマンスペクトルを示すのに対し, Slurry 法による生成物では CLZ 由来のピークが比較的大きく, 未反応の CLZ を多く含むことが示唆されたことから, 探索スクリーニングに利用した Slurry 法の精製条件では不十分であり, 最適化の必要性が示唆された。Spray-Drying 法では CLZ の残存は認められないものの, Figure 2-7 における PXRD ピーク強度は弱く, 非晶質状態の CLZ が含まれている可能性が示唆された。Figure 2-9 に示すように, 非晶質状態から Cocrystal (準安定晶) への変換には混合物のガラス転移点 T_g が関係しており, T_g 以下では不安定な非晶質状態を維持しやすい一方で, T_g 付近あるいはそれ以上の温度条件では準安定晶への変換が進行しやすくなる^{40,41)}。実際に Spray-Drying 法にて $40\text{ }^\circ\text{C}$ で真空乾燥することで非晶質状態から Cocrystal へ進行したことから, CLZ/4HBA complex のガラス転移点 T_g は室温から $40\text{ }^\circ\text{C}$ 付近にあるものと推測される。Figure 2-10 には CLZ crystal 及び CLZ-4HBA cocrystal の T_g 付近の DSC チャートを示すが, 想定された通りいずれも $30\sim 40\text{ }^\circ\text{C}$ 付近にガラス転移に伴う DSC カーブシフトが認められた (CLZ crystal の T_g は約 $33\text{ }^\circ\text{C}$, CLZ-4HBA cocrystal の T_g は約 $36\text{ }^\circ\text{C}$ に確認された)。

Dry grinding 法にて室温で粉砕処理された生成物も同様の要因で非晶質状態が維持されているものと推察される。一方で, 少量の溶媒が添加された LAG 法では同条件で Cocrystal 化が加速した。非晶質体への水や溶媒の添加は可塑的作用を促し Cocrystal 化を速める報告もあることから⁴²⁾, LAG 法ではエタノールの少量添加が触媒的な作用以外にも T_g を下げる効果を示したことも Cocrystal 化が進んだ一因として考えられるかもしれない。

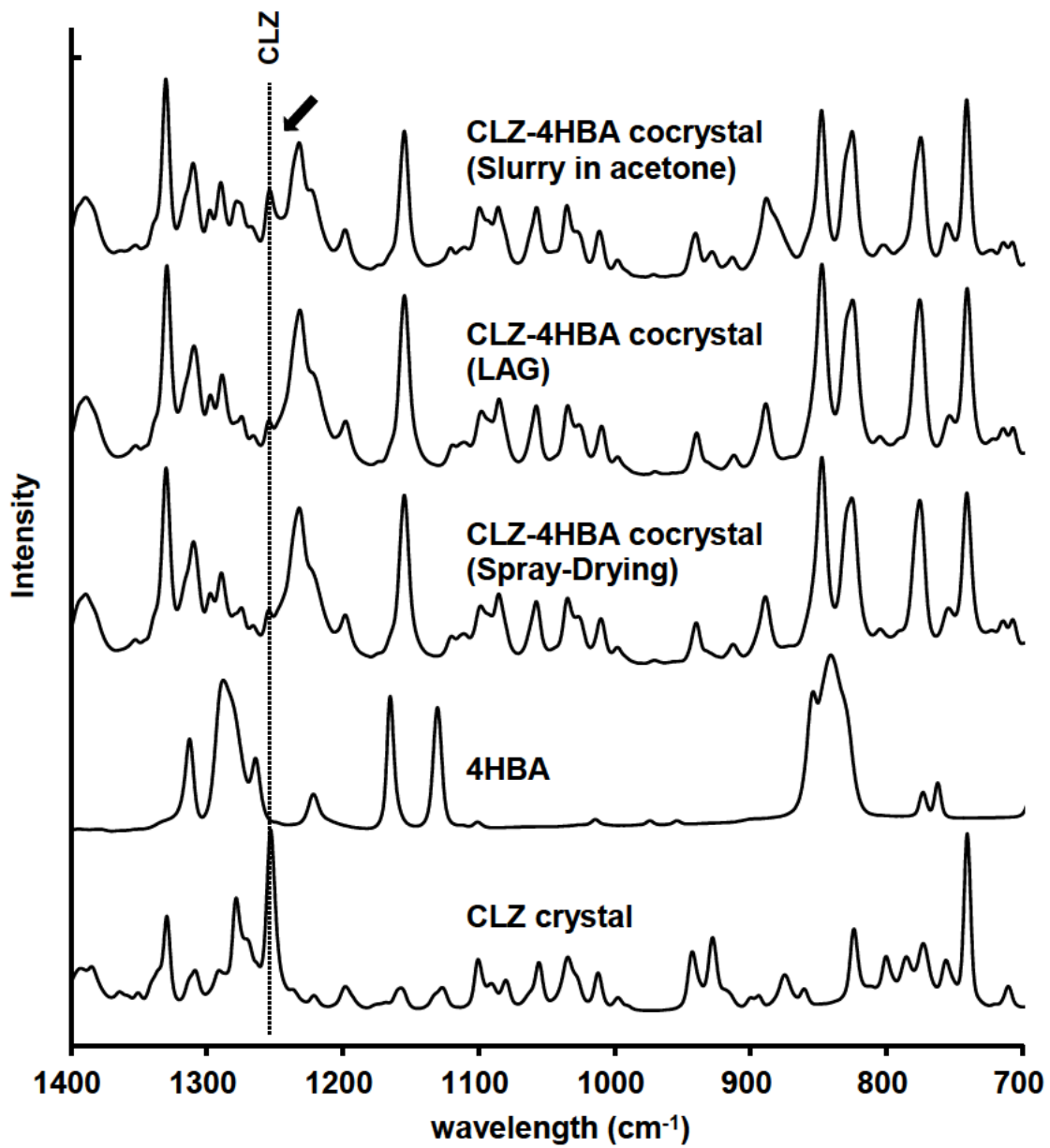


Figure 2-8. *In situ* Raman data of CLZ-4HBA cocrystals prepared by Slurry, LAG, and Spray-Drying and raw materials. The closed arrow indicates the specific peak of CLZ crystal.

Figure 2-9. Gibbs free enthalpy curve for crystal (stable), liquid (metastable) and glass. Paths 1 and 2 correspond to conventional and solid state vitrification paths respectively.⁴¹⁾

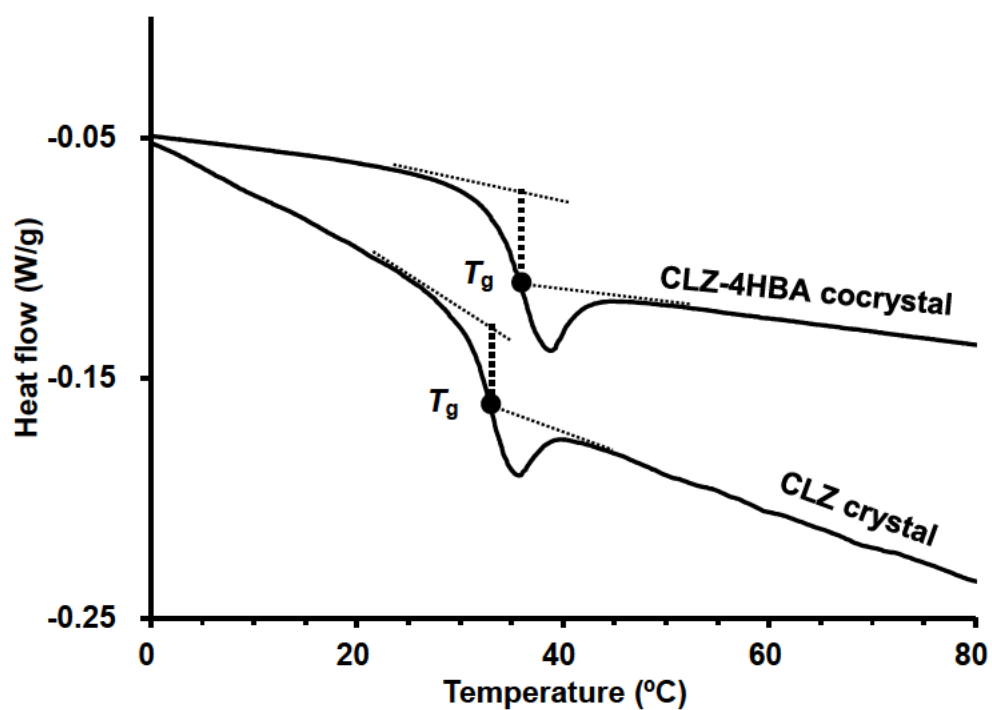


Figure 2-10. DSC curves of CLZ crystal and CLZ-4HBA cocrystal around glass temperature, T_g .

第3項 CLZ cocrystal の結晶構造解析

LAG 法で PXRD パターン変化が確認された 4 種の CLZ cocrystal に関して、Slurry 法での精製条件を参考に、それぞれ Single crystal 精製に適した条件を探索した。

CLZ-2,5DHBA cocrystal は探索スクリーニングの Slurry 法精製条件では確認されなかったが、過飽和濃度で調製することで結晶変換が進むことを見出し、温度条件の調整と共に Single crystal の精製に成功した。Figure 2-11-1, Figure 2-11-2, Figure 2-11-3, 及び Figure 2-11-4 には、LAG 法により得られた各生成物と Single crystal との XRD パターンの比較を示す。いずれも XRD パターンの一致が確認され、LAG 法で調製した生成物と Single crystal は同一結晶であることが示唆された（単結晶構造解析では極低温での測定のため、温度の影響を受けて結晶格子の伸縮に伴う回折角の微妙なズレは認められる）。Table 2-4 には結晶学的解析データ、Figure 2-12-1 及び Figure 2-12-2 には結晶構造解析により導き出された結晶パッキングの一部を示す。いずれも CLZ と Coformer とが化学量論比 1:1 で構成される Cocrystal であることが確認された。CLZ-3HBA cocrystal, CLZ-4HBA cocrystal, 及び CLZ-2,4DHBA cocrystal は類似の結晶パッキングを示しており、CLZ のテトラゾール骨格アミンとヒドロキシ安息香酸のカルボキシル基 ($N\cdots HO-C$)、カルボスチリル骨格アミンとヒドロキシ安息香酸のカルボキシル基 ($NH\cdots O=C$)、更にはカルボスチリルのカルボニル基とヒドロキシ安息香酸のパラ位またはメタ位水酸基

($C=O\cdots HO-C$) との 3 か所の水素結合が確認された。Figure 2-4 の PXRD でも類似のパターンを示しており、この結果からも類似の結晶格子が推察できる。CLZ-2,5DHBA cocrystal は他 3 種とは異なる結晶構造を有しており、CLZ のテトラゾール骨格アミンと 2,5DHBA のメタ位水酸基 ($N\cdots HO-C$)、CLZ のカルボスチリル骨格カルボニル基と 2,5DHBA のカルボキシル基 ($C=O\cdots HO-C$) とが水素結合を有し、更には CLZ のカルボスチリル骨格同志が 2 分子間で水素結合を形成していることが確認された。

Figure 2-12-1, 及び Figure 2-12-2 によると (参考資料の Figure S1, Figure S2, Figure S3, 及び Figure S4 に分子配向パッキングを記載), CLZ-3HBA cocrystal, CLZ-4HBA cocrystal, 及び CLZ-2,4DHBA cocrystal の結晶構造に対して、CLZ-2,5DHBA cocrystal では水素結合部位が多く、カルボスチリル芳香環の配向及び分子間距離から $\pi\cdots\pi$ 相互作用の可能性も考えられるため、比較的強固な結晶パッキングを有している可能性も示唆された。

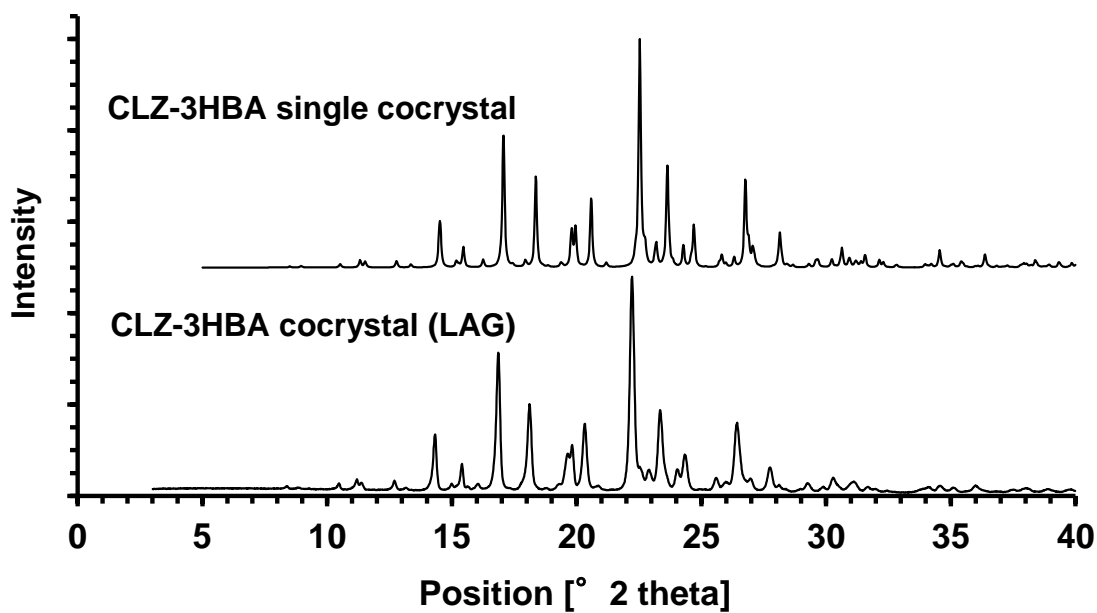


Figure 2-11-1. XRD patterns of CLZ-3HBA cocystal and single cocystal.

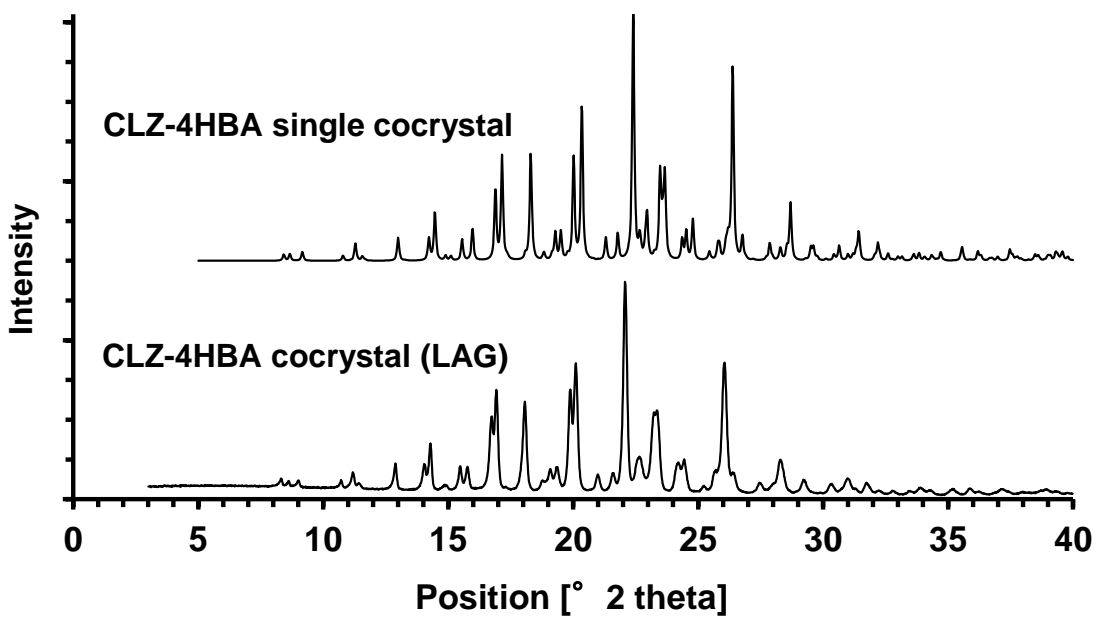


Figure 2-11-2. XRD patterns of CLZ-4HBA cocystal and single cocystal.

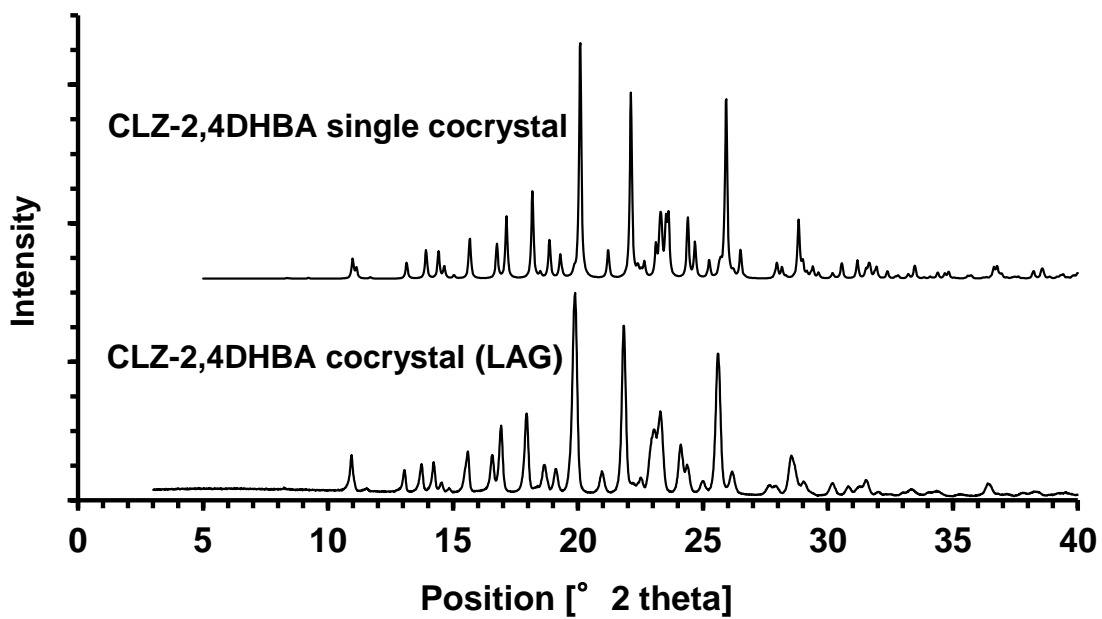


Figure 2-11-3. XRD patterns of CLZ-2,4DHBA cocrystal and single cocrystal.

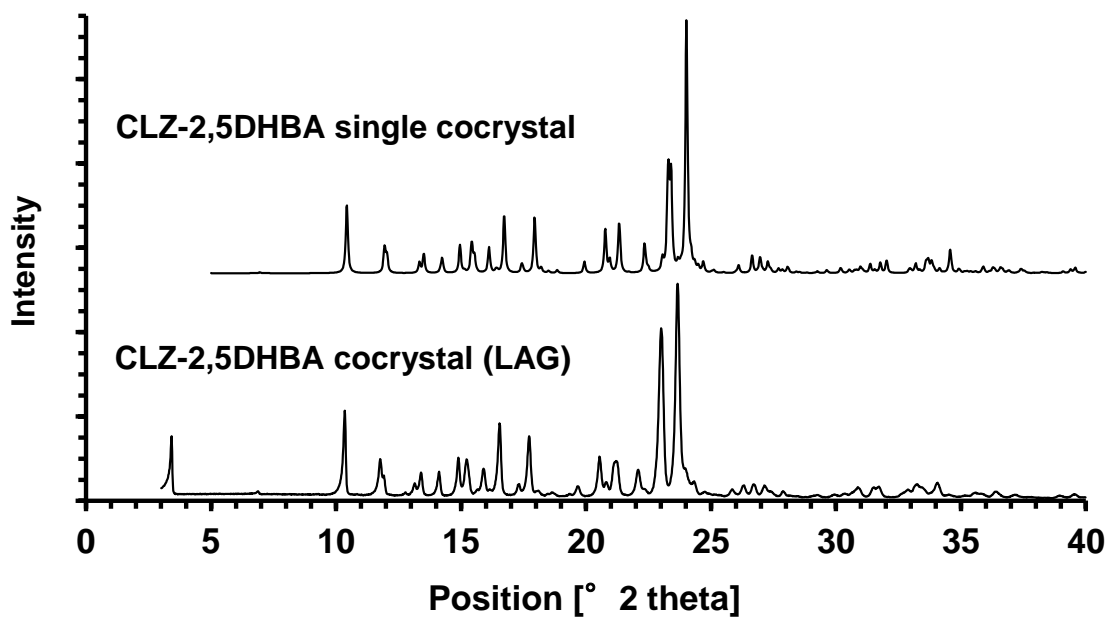


Figure 2-11-4. XRD patterns of CLZ-2,5DHBA cocrystal and single cocrystal.

Table 2-4. Crystallographic data for cocrystals

Substance	CLZ-3HBA	CLZ-4HBA	CLZ-2,4DHBA	CLZ-2,5DHBA
	cocrystal	cocrystal	cocrystal	cocrystal
Formula	C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₂ ·C ₇ H ₆ O ₃	C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₂ ·C ₇ H ₆ O ₃	C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₂ ·C ₇ H ₆ O ₄	C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₂ ·C ₇ H ₆ O ₄
Formula weight	507.59	507.59	523.59	523.59
Crystal system	monoclinic	monoclinic	monoclinic	triclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> -1
<i>a</i> (Å)	10.3531(4)	10.0087(3)	9.8623(3)	6.5572(4)
<i>b</i> (Å)	12.2095(4)	12.2329(4)	12.2726(5)	8.0563(6)
<i>c</i> (Å)	20.1329(8)	20.8433(6)	21.4036(7)	25.5616(16)
<i>α</i> (deg)	90	90	90	89.046(6)
<i>β</i> (deg)	101.129(7)	101.939(7)	103.442(7)	83.991(6)
<i>γ</i> (deg)	90	90	90	73.082(5)
<i>V</i> (Å ³)	2497.07(17)	2496.76(15)	2519.66(17)	1284.67(15)
<i>Z</i>	4	4	4	2
<i>D</i> _{cal} (g·cm ⁻³)	1.350	1.350	1.380	1.353
<i>μ</i> (mm ⁻¹)	9.47	9.47	9.90	9.71
<i>F</i> (000)	1080	1080	1112	556
2 θ max (deg)	55	55	55	55
Reflections collected	23772	23710	21465	12384
Independent reflections, <i>R</i> _{int}	5697, 0.0410	5697, 0.0319	5735, 0.0400	5859, 0.0365
<i>R</i> ₁ (<i>I</i> > 2.00 σ (<i>I</i>))	0.0417	0.0377	0.0420	0.0557
<i>R</i> (all reflections)	0.0626	0.0541	0.0649	0.0787
w <i>R</i> ₂ (all reflections)	0.0943	0.0919	0.0960	0.1422
$\Delta\rho_{\max}$, $\Delta\rho_{\min}$ (eÅ ⁻³)	0.27, -0.23	0.33, -0.21	0.31, -0.24	0.34, -0.30

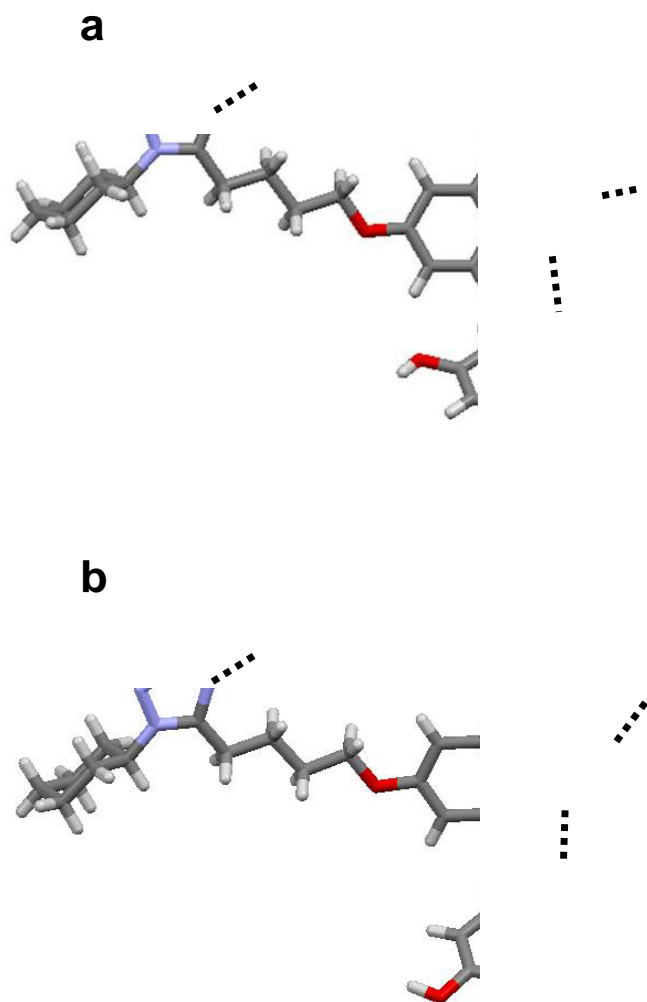


Figure 2-12-1. Fragments of the crystal structures of CLZ cocrystals. H-bond interactions are represented as dashed lines. (a) represents CLZ-3HBA cocrystal, and (b) represents CLZ-4HBA cocrystal.

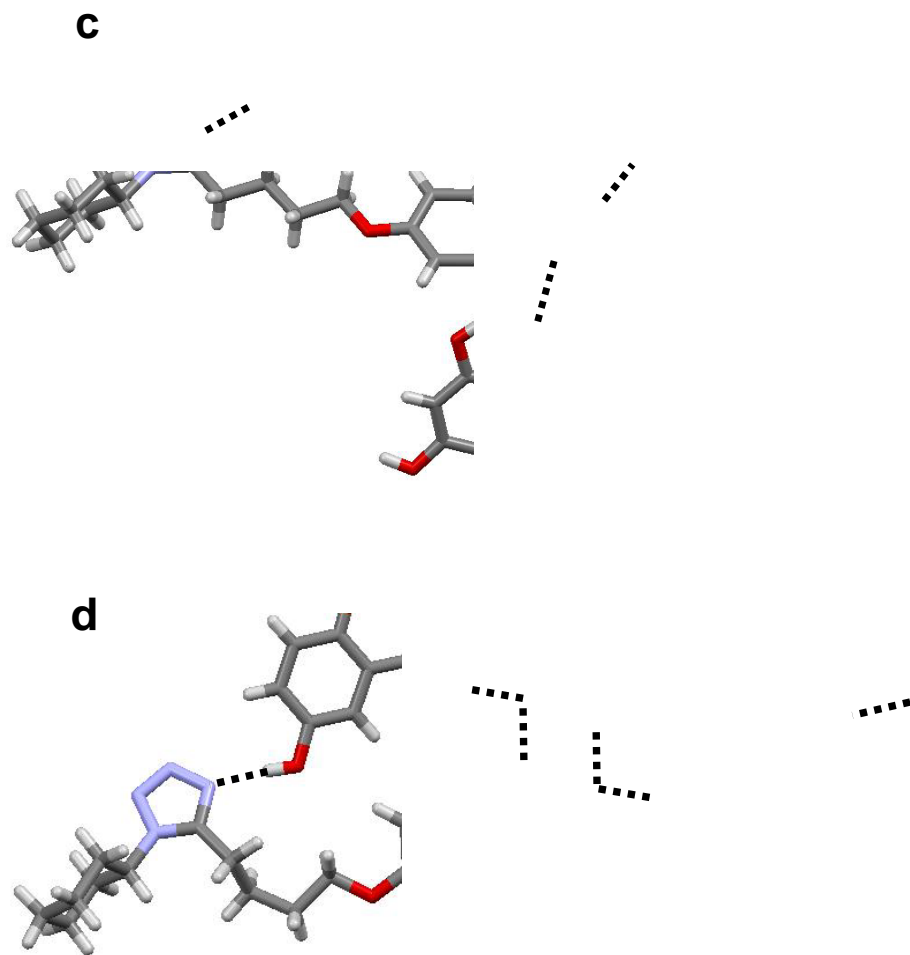


Figure 2-12-2. Fragments of the crystal structures of CLZ cocrystals. H-bond interactions are represented as dashed lines. (c) represents CLZ-2,4DHBA cocrystal, and (d) represents CLZ-2,5DHBA cocrystal.

第4項 ヒドロキシ安息香酸の配合による CLZ co-amorphous 設計と物理的安定性への効果

一般的に、非晶質固体分散体は熱力学的エネルギー状態が高く、物理化学的に不安定であることが知られている^{4,14,15)}、CLZ crystal の T_g は約 33 °C と低く、CLZ 単体では非晶質状態から CLZ crystal への容易な変換が考えられた。一方で、Figure 2-7 において、Spray-Drying 法にて調製された CLZ/4HBA complex 非晶質は安定晶である CLZ crystal への変換よりも準安定晶である CLZ-4HBA cocrystal への変換が進行することから、非晶質状態でも CLZ と 4HBA との水素結合に伴う部分的な相互作用が生じているものと示唆された。

そこで CLZ と 4HBA との部分的な水素結合が非晶質固体分散体の物理化学的安定性に影響を与える可能性を検証した。Figure 2-13 には各種非晶質固体分散体における 40 °C または 60 °C 条件で 2 週間保管した際の PXRD パターン変化を示す。CLZ/TC-5E の非晶質固体分散体において、開始時はハローパターンを示すものの、60 °C で 2 週間保管することで CLZ crystal 由来のピークが検出された。対して、4HBA を配合した非晶質固体分散体では 60 °C 条件でも CLZ crystal への結晶転移は確認されなかった。

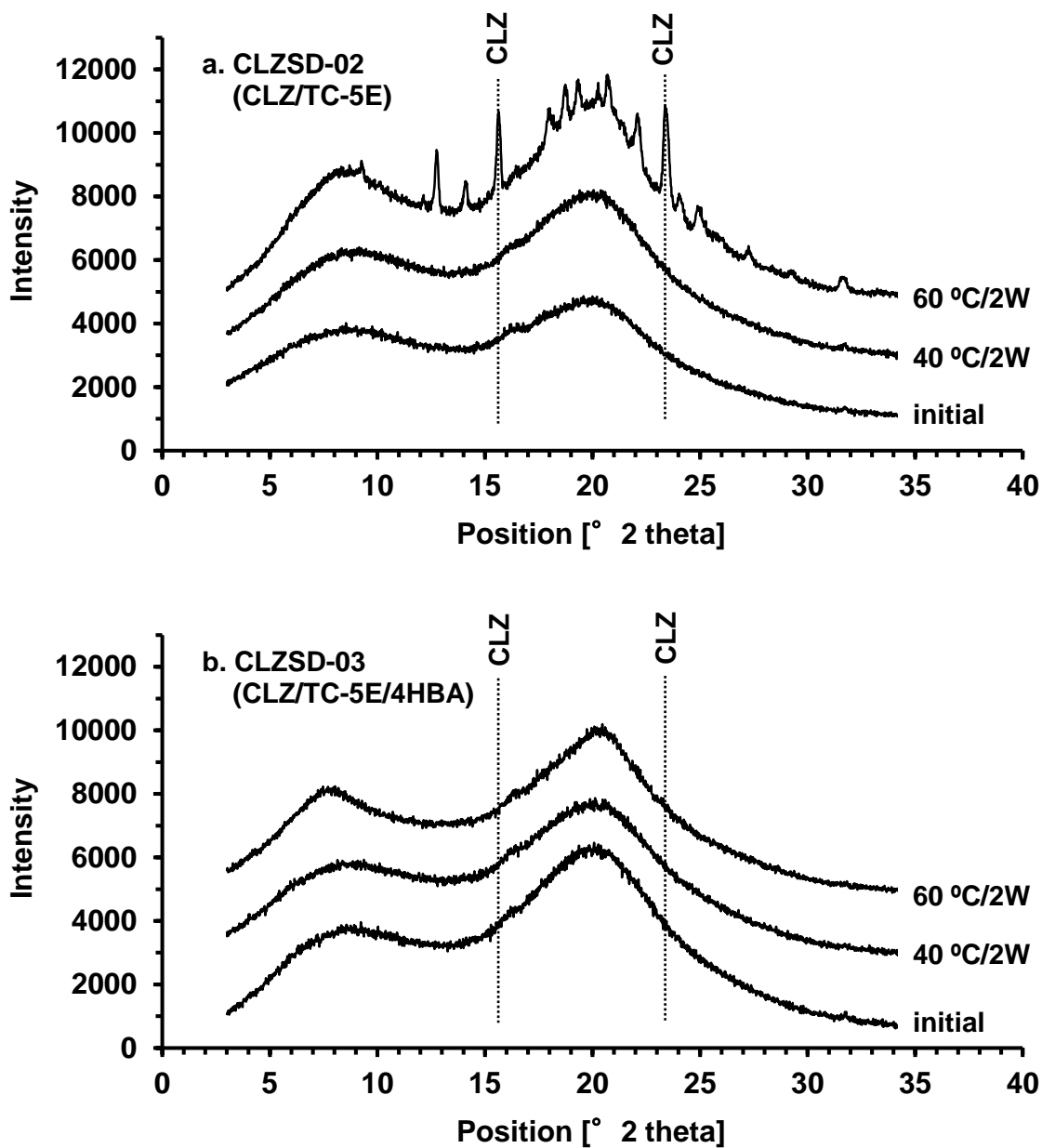


Figure 2-13. PXRD patterns of Spray-Dried powders consisting of CLZ. Below pattern, middle pattern, and upper pattern in each graph represent the initial powder, the powder stored for 2 weeks at 40 °C in a glass vial, and the powder stored for 2 weeks at 60 °C in a glass vial, respectively. The dashed lines represent the specific peaks of CLZ crystal.

Figure 2-14 には非晶質固体分散体への 4HBA の配合に伴う DSC チャートの変化を示す。4HBA 配合に関わらず、いずれもガラス転移点 T_g が 40 °C 付近に認められ、ほとんど違いはない。しかし、温度上昇に伴い 4HBA を含まない非晶質固体分散体では 140 °C 付近に CLZ の再結晶化による発熱ピークが認められるのに対し、4HBA を配合した非晶質固体分散体では再結晶化が抑制されることが確認された。故に、CLZ と 4HBA は co-amorphous^{43,44)} のように非晶質状態であっても水素結合を一部形成しており、CLZ 非晶質の再結晶化はこの水素結合によって安定化されていると考察された。

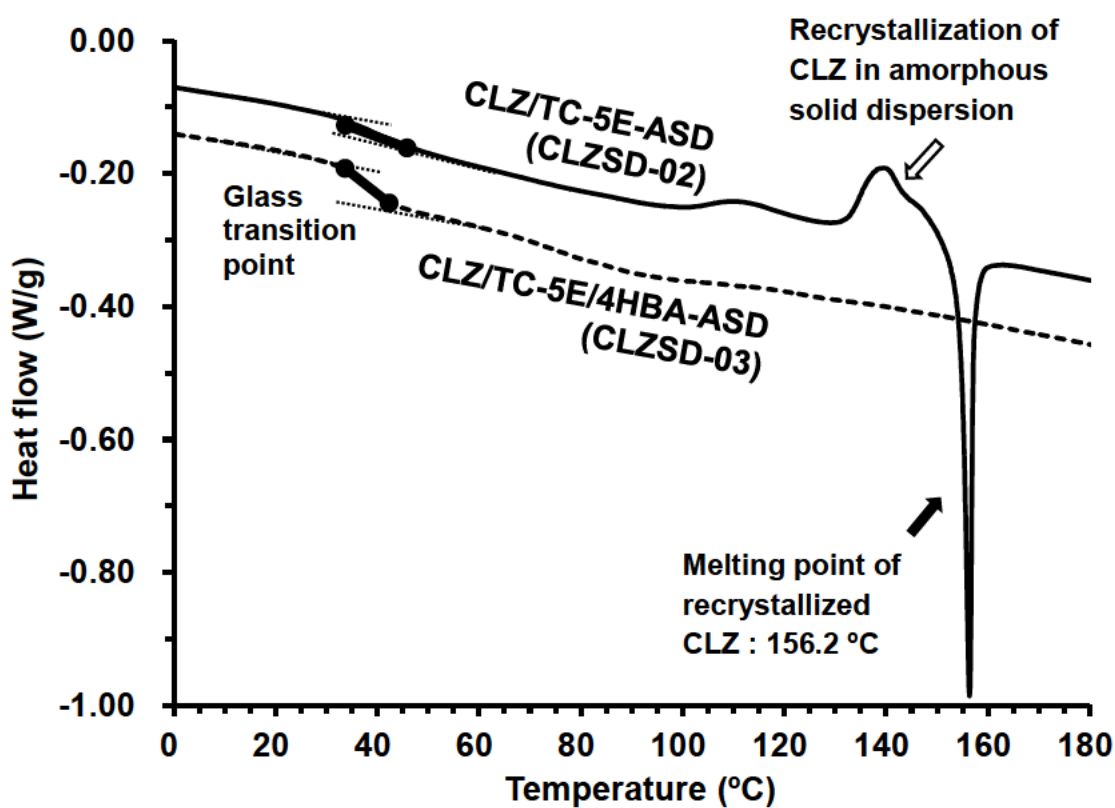


Figure 2-14. DSC curves of Spray-dried powders consisting of CLZ. The solid line represents DSC curve of CLZ amorphous solid dispersion (CLZ-ASD), and the dashed line represents that of CLZ-ASD containing 4HBA. The open arrow indicates the exothermic peak of recrystallization of CLZ in the amorphous solid dispersion. The closed arrow indicates the melting point of recrystallized CLZ in the amorphous solid dispersion (156.2 °C).

第4節 小括

CLZ とヒドロキシ安息香酸誘導体との Cocrystal スクリーニングを実施したところ、LAG 法にて 3HBA, 4HBA, 2,4DHBA, 及び 2,5DHBA の 4 種の Coformer との組合せで PXRD パターン変化が確認され、結晶構造解析からいずれも化学量論比 1:1 の Cocrystal の形成が確認された。Slurry 法では 3HBA, 4HBA, 及び 2,4DHBA の Coformer との組合せで同様の Cocrystal の形成が認められた。Spray-Drying 法では一時非晶質状態を経由して CLZ-4HBA cocrystal を形成することが確認され、CLZ/4HBA complex の T_g (30~40 °C) 以上の温度環境では、非晶質状態から Cocrystal 変換の加速が示唆された。CLZ cocrystal は物理的安定性も良好であり、CLZ-4HBA cocrystal は 60 °C 2 週間保管でも Cocrystal を維持することが確認された。対して、非晶質固体分散体は 60 °C で CLZ crystal への変換が確認された。この非晶質固体分散体は Coformer (4HBA) を配合することで物理的安定性が向上することから、非晶質状態でも CLZ-4HBA 水素結合により CLZ crystal の変換が抑制されるものと推察された。

最後に、本章で探索スクリーニングしたヒドロキシ安息香酸誘導体のうち、2HBA または Benzoic acid ではいずれの方法でも Cocrystal の形成は認められないこと、ジヒドロキシ安息香酸でも Cocrystal を形成することから、CLZ cocrystal に関して以下のことが考察できた。

- ① Coformer の芳香環に少なくとも 2 つ以上の水素結合エージェント（水酸基またはカルボキシル基）を有すること。
- ② 水酸基はパラ位またはメタ位に必要であり、オルト位ではパッキングを維持できない。
- ③ ただし、パラ位またはメタ位に水酸基を有していればオルト位の水酸基は Cocrystal 形成の障害にはならない（立体的障害を伴っている訳ではない）。

第3章 ヒドロキシ安息香酸誘導体の位置異性体によって構成される CLZ cocrystal の溶解特性の評価と *in vivo* 経口吸収性との関係性

第1節 諸言

Cocrystal の有用性は前章までに論じた通りであるが、医薬品用途として Cocrystal 開発を進める上で、共晶させる Coformer の安全性情報は当然重視される。医薬品開発で使用する Coformer の選択には、一般的には GRAS (Generally Recognized As Safe⁴⁵⁾, FDA) の記載情報が参考とされることが多い¹⁴⁾。探索スクリーニングで使用したヒドロキシ安息香酸誘導体はいずれも GRAS には記載されていないものの、過去の知見^{46,47)}や非臨床の安全性データ^{48,49)}を基に医薬品原体としての Coformer 候補として利用されている。

Cocrystal の商業化研究は 2004 年の Almarsson と Zaworotko の報告⁵⁰⁾をきっかけに加速し、溶解改善効果と物理化学的安定性を合わせ持つ製剤技術として近年でも多くの研究がなされている。中でも Cocrystal の溶解改善に関する研究報告は特に大きなウェイトを占めるが、その多くは Cocrystal (Coformer 違いを含む) や他の各種原体 (塩, 非晶質固体分散体など) との *in vitro* 溶出プロファイルの単純な比較検証であり、Cocrystal の溶解特性の実質的把握や *in vivo* 経口吸収性との関係性の理解は未だ進んでいない。

そこで本章では、4HBA, 2,4DHBA, 及び 2,5DHBA の 3 種のヒドロキシ安息香酸の位置異性体を対象として、CLZ cocrystal の溶解特性に与える影響を評価すると共に、*in vivo* 経口吸収性との関係性を検証することとした。Table 3-1 に示すように、対象とした Coformer は水酸基の置換位置によって固有の溶解度を示す。Cocrystal としての溶解特性は Coformer の溶解度と相関する傾向があることから³⁹⁾、類似の Coformer で形成される Cocrystal でも溶解特性が異なることが推測される。過去にも、数種の Coformer によって精製された同一薬物の Cocrystal において、Coformer の物理化学的性質に伴って、それぞれ固有の溶解特性や膜透過性、経口吸収性を示す事例も報告されている⁵¹⁻⁵³⁾。

Table 3-1. The solubility and pK_a of coformers

Coformer	4HBA	2,4DHBA	2,5DHBA
Solubility at 25 °C (mg/mL)	4.9 ^a	6.0 ^b	22 ^b
pK _a	4.53 ^c	3.22 ^c	2.93 ^d

^a extracted from the study report of M. Dymicky et al.⁵⁴⁾ ^b extracted from the study report of K. Herzog et al.⁵⁵⁾ ^c extracted from the study report of G. Kortüm et al.⁵⁶⁾

^d extracted from “*the handbook of pharmaceutical salts properties, selection, and use*”.⁵⁷⁾

CLZ cocrystal の平衡溶解度は溶解度積 K_{sp} で評価した。CLZ と Coformer とが化学量論比 1:1 で Cocrystal を形成することから、溶解度積 K_{sp} は Coformer 濃度の逆数と CLZ の溶解度とのプロットから Equation 1 を用いて算出できる⁵⁸⁾。ここで、 K_{11} は溶液中での CLZ と Coformer との複合体形成における結合定数を表す。

$$[CLZ]_T = \frac{K_{sp}}{[coformer]_T} + K_{11}K_{sp} \quad (\text{Equation 1})$$

また、Coformer として使用したヒドロキシ安息香酸誘導体は解離基を有する酸性化合物であり、溶液の pH に伴い分子型/イオン型分率に変化する。Table 3-1 には各種ヒドロキシ安息香酸の pK_a を示すが、水酸基が多いほど pK_a が低い傾向が確認される。溶液中でのプロトン濃度が低下するほど Coformer のイオン型比率が pK_a を境に指数関数的に増加し、それに伴い Cocrystal の溶解度は pH の影響を大きく受け、溶解度は飛躍的に増加する^{39,59)}。膜透過性の良好な CLZ では経口投与後の t_{max} がイヌで 1~2 hr²³⁾、ヒトで 2~2.5 hr⁶⁰⁾ と比較的速く、絶食条件での胃排泄時間がイヌで約 1.4 hr⁶¹⁾、ヒトで約 1.5 hr⁶²⁾ とほぼ近いことを考慮すると、胃内環境のような酸性 pH 条件における溶解特性の評価が重要となると考えられる。故に本研究では、溶解度積 K_{sp} は pH1.2 の Simulated Gastric Fluid (以下 SGF と示す) にて評価することとした。酸性 pH 条件では Coformer はほぼ分子型で存在すると考えられるため、Equation 1 にて算出された K_{sp} と K_{11} を用いて導き出される理論関係式と、CLZ と Coformer とが化学量論比 1:1 で示される直線との交点が Cocrystal の溶解度と算出できる³⁹⁾。Cocrystal の溶解度が CLZ の溶解度に比べて相対的に高い場合、準安定晶である Cocrystal は動的溶出試験において一時的な過飽和濃度を示すことが示唆される。故に、溶出試験における過飽和は安定晶 CLZ の溶解度に対

する Cocrystal 溶解度の相対比率と関係性があるものと想定されるため、本章ではその関係性を明らかにすることで、溶解性の改善及びBAの最大化のために、最適な Coformer 選択のための足掛かりを確立することを目的としている。

第2節 実験試料及び方法

第1項 実験試料

CLZは大塚製薬株式会社（徳島）にて合成・粉碎されたハンマーミル処理原末を使用した。CLZの非晶質固体分散体（以下CLZ-ASDと示す）は第2章でSpray-Drying法にて調製したCLZSD-02を使用した。Coformerとして使用した、4-Hydroxybenzoic acid（以下4HBAと示す）、2,4-Dihydroxybenzoic acid（以下2,4DHBAと示す）、2,5-Dihydroxybenzoic acid（別名Gentisic acid, 以下2,5DHBAと示す）は第2章で示した試薬グレードを使用した。溶出試験で使用したHypromellose（type 2910, grade TC-5E）は信越工業株式会社（東京）から提供された。同じく溶出試験における倍散媒体に使用した乳糖（Pharmatose 200M）はDFE Pharma Ltd.（Goch, Germany）から、軽質無水ケイ酸（Aerosil 200）は日本アエロジル株式会社（東京）から提供された。その他の試薬は和光純薬工業株式会社（大阪）の試薬グレードを使用した。

第2項 実験方法

1. Slurry法によるCLZ cocrystalの精製

第2章にて精製が確認されたCocrystalのうち、CLZ-4HBA cocrystal, CLZ-2,4DHBA cocrystal, 及びCLZ-2,5DHBA cocrystalの3種を対象として、Figure 3-1に示す調製フローに従って条件を最適化してCocrystalを精製した。具体的には、CLZを10g秤量し、4HBAまたは2,4DHBAをCLZに対して化学量論比で1:2となるように溶解したアセトン40mLに添加して懸濁分散し、振とう攪拌しながら7日間室温で処理を継続してCocrystalを精製した。2,5DHBAとのCocrystalはCoformer濃度が高い条件でのみ得られるため、別途以下に示す手法で精製した。CLZを10g秤量し、2,5DHBAをCLZに対して化学量論比で1:1.6となるように溶解・分散した（飽和溶解度を超えて添加）アセトン15mLに添加し、40℃の温度条件で攪拌しながら7日間処理を継続してCocrystalを精製した。得られた懸濁液は吸引濾過して残渣を回収し、40℃で12hr真空乾燥して各種Cocrystalを得た。

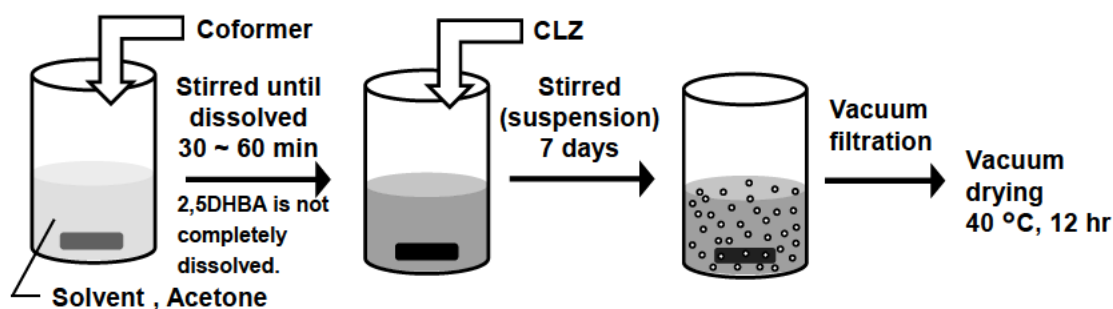


Figure 3-1. The preparation flow of CLZ cocrystals by Slurry method.

2. Powder and Single-crystal X-ray Diffraction

第 2 章に示す方法と同様に分析した。

3. 熱力学的特性の評価

第 2 章に示す方法と同様に分析した。

4. 粒度分布測定

島津製作所株式会社（京都）のレーザー回折式粒度分布測定装置 SALD-3000J を用いて CLZ 原体の粒度分布を測定した。CLZ は 1% Hypromellose 水溶液に 2.5 mg/mL となるように懸濁分散して測定サンプルとした。CLZ cocrystal は懸濁時の脱 Cocrystal を防止するために、各々対象となる Coformer を加えた Hypromellose 水溶液で懸濁した。具体的には、CLZ-4HBA cocrystal は 0.1% 4HBA を含む 1% Hypromellose 水溶液、CLZ-2,4DHBA cocrystal は 0.1% 2,4DHBA を含む 1% Hypromellose 水溶液、CLZ-2,5DHBA cocrystal は 0.25% 2,5DHBA を含む 0.5% Hypromellose 水溶液に、それぞれ CLZ として 2.5 mg/mL となるように懸濁分散して測定サンプルとした。測定に使用する循環溶液としては、CLZ-4HBA cocrystal では 0.1% 4HBA 水溶液、CLZ-2,4DHBA cocrystal では 0.1% 2,4DHBA 水溶液、及び CLZ-2,5DHBA cocrystal では 0.5% 2,5DHBA 水溶液をそれぞれ使用した。

5. 溶解度積を利用した CLZ cocrystal の平衡溶解度の評価

本研究では SGF での溶解度積 K_{sp} を算出し、第 1 節にて示した手法で CLZ cocrystal の平衡溶解度を算出した。Table 2-1 に示す各種 Coformer の溶解度を参考に、4HBA に関しては 0.2-4.0 mg/mL、2,4DHBA に関しては 0.3-8.0 mg/mL、2,5DHBA に関しては 0.4-10.0 mg/mL の範囲の濃度で SGF に溶解させ、各々の coformer に対応する CLZ cocrystal を飽和溶解度以上となるように投入した 20 mL の懸濁分散液を 37 °C の温浴で 1 Hz の速度で 4 日間振とうさせた。振とうさせた懸濁液は、残渣を PXRD にて分析すると共に、0.22 μm のフィルターでろ過したろ液を HPLC にて定量した。

6. 溶出試験

撥水性を有する CLZ 原末の溶出試験における速やかな分散を促すために、乳糖と軽質無水ケイ酸を質量比 49:1 で混合した混合末を用いて、試料サンプルに対して質量比で 4 倍量加えて事前に混合した。1% Hypromellose を含む SGF を 100 mL 分取し、液温度を 37 \pm 1 °C で維持させた。攪拌速度は 500 rpm とし、試験薬物用量は 5 mg、10 mg、または 50 mg で溶出試験を実施した。試験開始から所定のタイムプログラムで 1~2 mL ずつサンプリングし、0.22 μm のフィルターでろ過してろ液を HPLC にて定量した。

7. HPLC による CLZ 濃度の定量

Slurry 法にて精製された Cocrystal の定量、更には溶解度測定及び溶出試験サンプルにおける CLZ 濃度の測定は 257 nm にセットされた UV 検出器を備えた HPLC システム LC-2010C (島津製作所, 京都) にて実施した。分析には C18 カラム (TSK gel ODS-80Ts, 4.6 mm i.d. \times 150 mm, 東ソー株式会社, 東京) を用い、移動相は水/アセトニトリル/メタノール混合液 (10:7:3, v/v/v) を 1.5 mL/min で送液した。内部標準溶液はベンゾフェノン を 40 $\mu\text{g/mL}$ 濃度でメタノールに溶解させた溶液を使用し、試料溶液と体積比で 1:1 となるように混合して測定サンプルとした。

8. ビーグル犬を用いた経口吸収性の評価

CLZ またはその Cocrystal は、CLZ として 2.5 mg/mL 濃度で 1% Hypromellose 水溶液に懸濁させた投与液を 4 匹のビーグル犬（体重 8 - 12 kg）に 100 mg / 40 mL / body の用量で経口投与させた。投与における休薬期間は 1 週間とし、投与前 12 時間および投与後 8 時間は絶食させた。また、ビーグル犬は試験中でも飲水は自由にアクセスできる状態とした。試験サンプルを経口投与後、0 (pre-dose), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 及び 8 hr の時点で前脚静脈より血液サンプルを 1~2 mL 採取し、シリンジに入れて分析まで -20 °C で保管した。

9. 血清中 CLZ 濃度の定量

血清中の CLZ は OPC-3930 を内部標準として、LC-MS-MS Quattro-Micro (Waters, Milford) を用いて定量した。HPLC グレードの *tert*-butyl methyl ether を用いて血清サンプル 0.1 mL から CLZ と OPC-3930 を抽出した後に、有機溶媒を蒸発乾固し、メタノール/水混合液 (50:50, v/v) を 0.2 mL 加えて再溶解させた。分析には Acquity UPLC BEH C18 カラム (2.1×50 mm, 1.7 µm, Waters) を使用し、移動相には水/アセトニトリル/ギ酸 (50:50:0.1, v/v/v) を 0.25 mL/min で送液した。CLZ 及び OPC-3930 は Parent イオンとして *m/z* 370.5, Daughter イオンとして *m/z* 272.5 をそれぞれ検出した。検量線における標準溶液のレンジは 10~5000 ng/mL とし、標準溶液の変動係数は 0.1~20.0% のレンジで設定した。

10. PK パラメータの解析

In vivo PK パラメータは WinNonlin (version 6.4, Pharsight, Mountain View, CA) を用いて解析した。CLZ 血清中濃度-時間曲線下面積 (AUC) と平均滞留時間 (MRT) は 0~8 hr の範囲で台形公式にしたがって算出した。CLZ の最大血清中濃度を C_{max} , その時の時間を t_{max} と定義した。PK パラメータの統計解析は Microsoft Excel を用いて Dunnett's 検定によって実施した。有意差の指標は *p*-value が 0.05 以下とした。

第3節 実験結果及び考察

第1項 Slurry 法にて精製された CLZ Cocrystal の物理化学的性質の評価

精製条件を最適化した Slurry 法にて得られた CLZ-4HBA cocrystal, CLZ-2,4DHBA cocrystal, 及び CLZ-2,5DHBA cocrystal の定量結果を Table 3-2 に示す。いずれも 95~100% の定量結果が確認され、未反応の CLZ 及び Coformer をほとんど含まないことが確認された。CLZ cocrystal の PXRD パターンを Figure 3-2-1, Figure 3-2-2, 及び Figure 3-2-3 にそれぞれ示す。いずれの Cocrystal でも、CLZ 及び Coformer 由来とも異なる PXRD パターンを示し、Single cocrystal で確認された Figure 2-11-2, Figure 2-11-3, 及び Figure 2-11-4 とそれぞれ同一の XRD パターンを示すことが確認された。

Table 3-3 には DSC によって得られた熱力学的パラメータを示す。Slurry 法で精製された Cocrystal は、Table 2-3 に示した LAG 法にて得られた Cocrystal の測定結果とほぼ近い値が確認され、製法に伴う影響は小さいことが示唆された。ここで、理想溶液における固体の溶解度は溶解熱量 ΔH_{sol} を融解熱量 ΔH_m と同等とみなすことで以下の式で算出できる³⁹⁾。

$$\ln x_{\text{solute}}^{\text{ideal}} = \frac{-\Delta H_m (T_m - T)}{R (T_m T)} \quad (\text{Equation 2})$$

ここで、 x は溶質のモル分率、 T_m は融解温度、 R は気体定数を示す。Table 3-3 には熱力学的データと Equation 2 によって算出された溶解度を合わせて示す。Figure 2-12-2 に示す CLZ-2,5DHBA cocrystal の結晶構造解析からは、比較的強固な結晶パッキングを有する可能性を示唆したが、DSC データから、融点及び融解熱量は共に低く、Cocrystal の結晶格子の強度 (Strength of crystal lattice¹⁴⁾) は低いことが推定された。実際に、熱力学的データから算出される溶解度は CLZ-2,5DHBA cocrystal で最も高い。更には、2,5DHBA は Table 3-1 に示すように溶解度が高く、Cocrystal 成分の解離 (Solvation of cocrystal component¹⁴⁾) も進みやすいことが推定された。結晶格子の強度と Cocrystal 成分の解離は、Cocrystal の溶解度を決定する上で重要なファクターであり¹⁴⁾、故に CLZ-2,5DHBA cocrystal は溶解度が高いことがこの結果からも考察された。結晶構造からは複数の水素結合と $\pi \cdots \pi$ スタッキングが示唆されたものの、結晶格子の強度とは必ずしもリンクせず、どちらかと言えばカルボキシル基に対して芳香環を挟んで点対称に水酸基を有する

構造上の特徴の方が結晶格子の強度に大きく影響しているように見える。この Coformer の分子構造が Cocrystal の結晶パッキングの安定化に寄与しており、逆に点対称の位置から水酸基が外れていくにつれて結晶構造が不安定になることが類推された。

Table 3-2. Assay data of CLZ cocrystals prepared by Slurry method

Substance	CLZ-4HBA cocrystal	CLZ-2,4DHBA cocrystal	CLZ-2,5DHBA cocrystal
Assay (%)	95.1	98.7	96.3

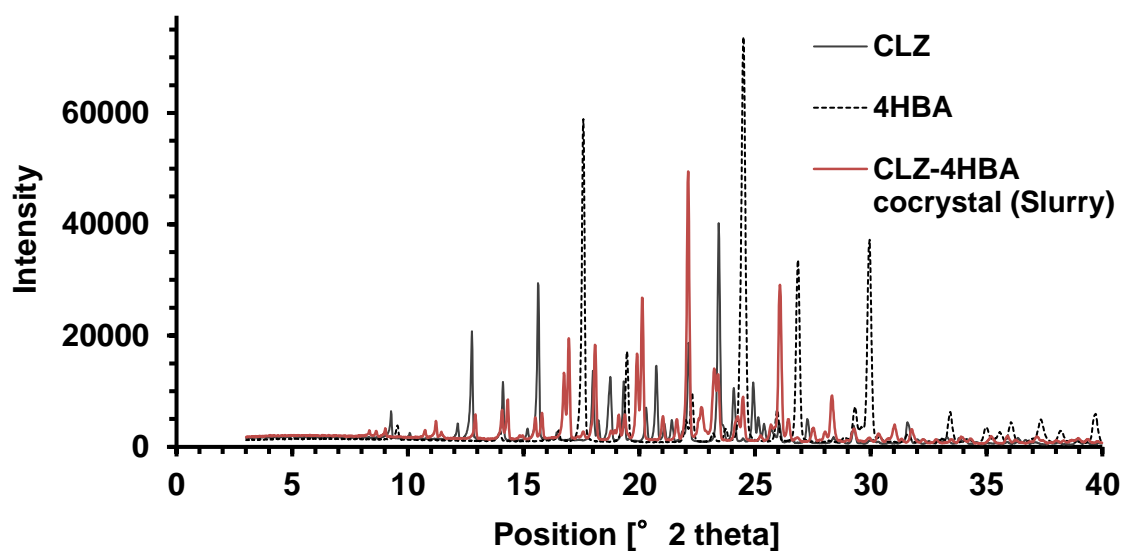


Figure 3-2-1. PXRD patterns of CLZ-4HBA cocrystal and raw materials.

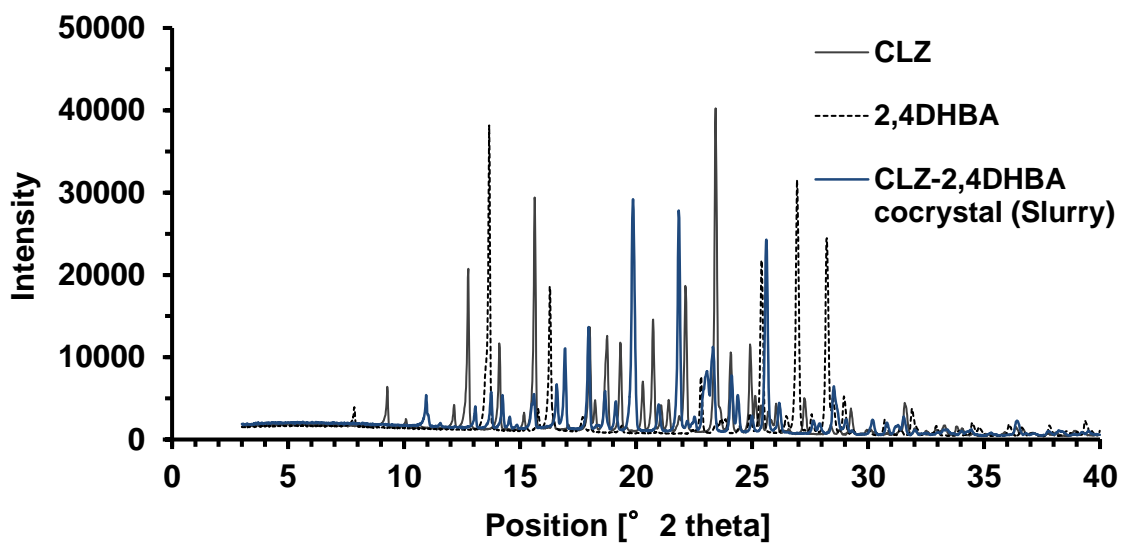


Figure 3-2-2. PXRD patterns of CLZ-2,4DHBA cocystal and raw materials.

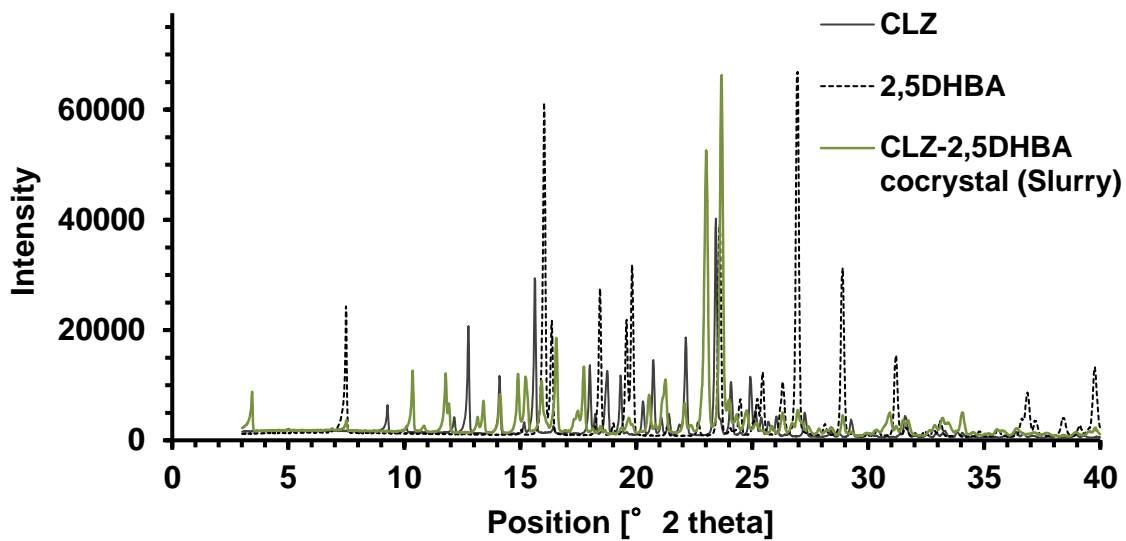


Figure 3-2-3. PXRD patterns of CLZ-2,5DHBA cocystal and raw materials.

Table 3-3. Melting points and enthalpy values for cocrystals and host crystal.

Substance	CLZ-4HBA cocrystal	CLZ-2,4DHBA cocrystal	CLZ-2,5DHBA cocrystal	CLZ crystal
Melting point (°C)	161.7	152.9	120.6	159.7
Enthalpy of melting ΔH_m (kJ/mol) ^a	41.5	35.6	27.1	51.0
Predicted solubility ratio, S_{CC}/S_{drug} ^b	2.4	4.7	10.1	---

^a The enthalpy of melting for cocrystals is normalized by moles of component molecules (drug + coformer) per mole of cocrystal.

^b The ratio of the calculated solubility of CLZ cocrystals to CLZ crystal from Equation 2.

Slurry 法にて精製した CLZ cocrystal の SEM 写真を Figure 3-3, 粒度分布を Figure 3-4 に示す。CLZ に対して、いずれの CLZ cocrystal もほぼ類似の粒子径を示し、CLZ の 50% 粒子径 20.2 μm に対し、CLZ-4HBA cocrystal では 21.4 μm , CLZ-2,4DHBA cocrystal では 21.9 μm , CLZ-2,5DHBA cocrystal では 22.1 μm であった。CLZ-2,5DHBA cocrystal は Slurry 法での精製濃度及び粘度が高いため、微細結晶と粗大結晶が混在しており、ブロードな粒度分布を示すことが確認された。

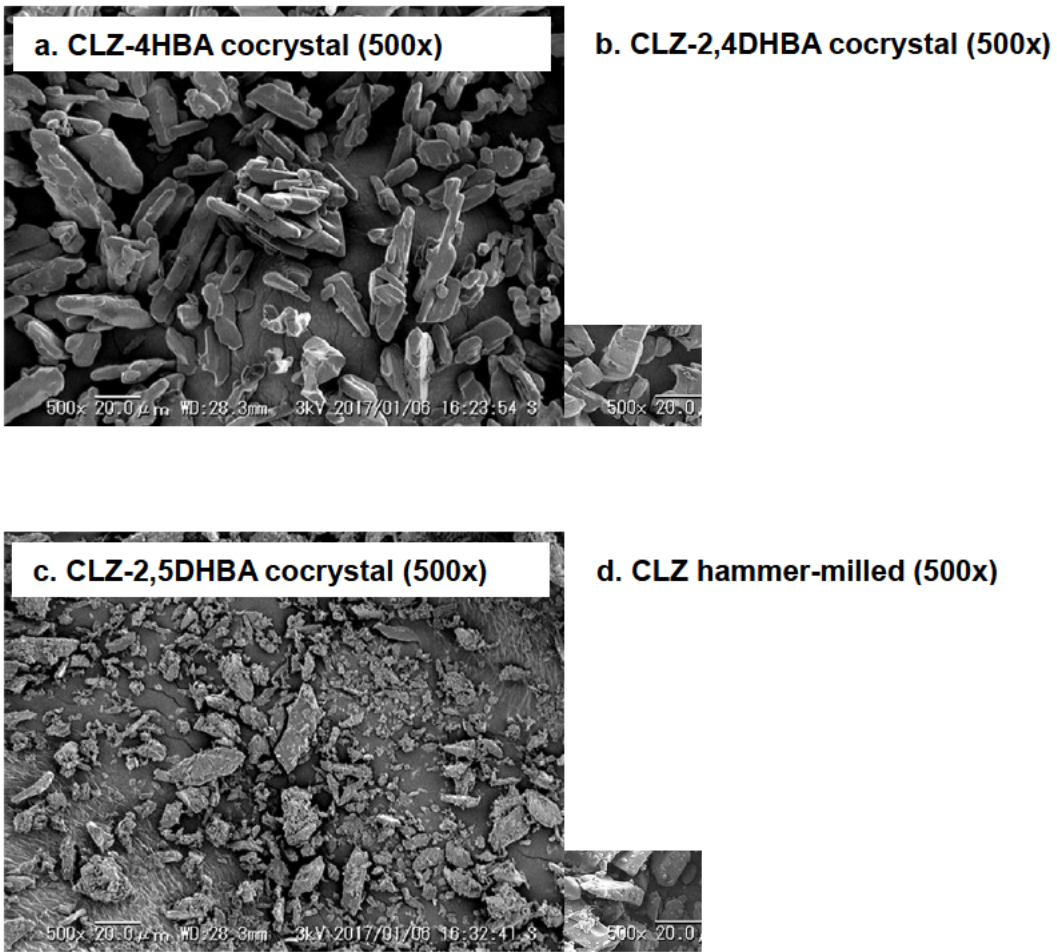


Figure 3-3. SEM images of CLZ cocrystals prepared by Slurry method. (a) CLZ-4HBA cocrystal, (b) represents CLZ-2,4DHBA cocrystal, (c) represents CLZ-2,5DHBA cocrystal, and (d) represents CLZ hammer-milled.

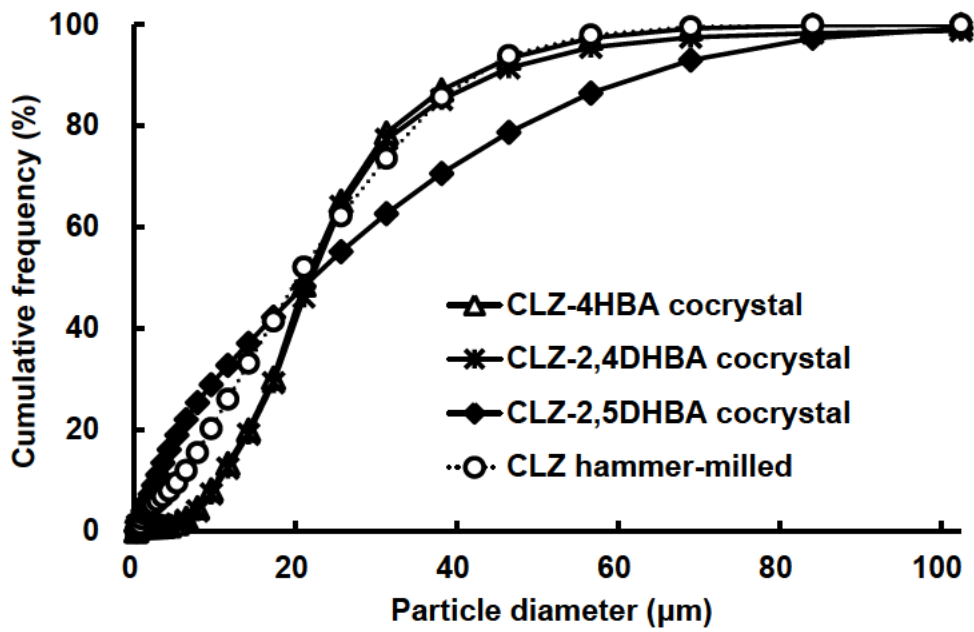


Figure 3-4. Particle size distribution of CLZ cocrystals and hammer-milled CLZ.

第2項 溶解度積から算出された平衡溶解度の評価

Coformer 濃度の異なる SGF に各々の CLZ cocrystal を飽和濃度で加え、そのときの CLZ の平衡溶解度を測定し、各種 Coformer 濃度の逆数に対する CLZ 溶解度を Figure 3-5 にプロットした。ここで、試験サンプルで認められる沈殿残渣を PXRD 分析して Cocrystal として確認されたもののみをプロットに使用し、Coformer あるいは CLZ 由来であった試験サンプルはここでは除外した。いずれの Cocrystal でも高い相関係数を示す直線式で近似でき、Equation 1 を用いて溶解度積 K_{sp} および溶液中での複合体形成に伴う結合定数 K_{11} をそれぞれ算出し、結果を Table 3-4 に示す。溶液中での複合体形成の結合定数を示す K_{11} は CLZ-4HBA cocrystal, CLZ-2,4DHBA cocrystal, 及び CLZ-2,5DHBA cocrystal それぞれ、 28.0 M^{-1} , 14.4 M^{-1} , 及び 6.0 M^{-1} であり、過去の報告と比較しても高い値を示すことから⁵⁸⁾, CLZ はヒドロキシ安息香酸誘導体と Solute...Solute 相互作用を取りやすいことが示唆された。特に CLZ-4HBA cocrystal では K_{11} が最も高いため、第2章の第4項で示した非晶質状態での物理化学的安定性にも効果があると同時に、溶液状態でも部分的に形成が予想される分子間相互作用によって、CLZ の再結晶化阻害への一定の効果も示唆された。

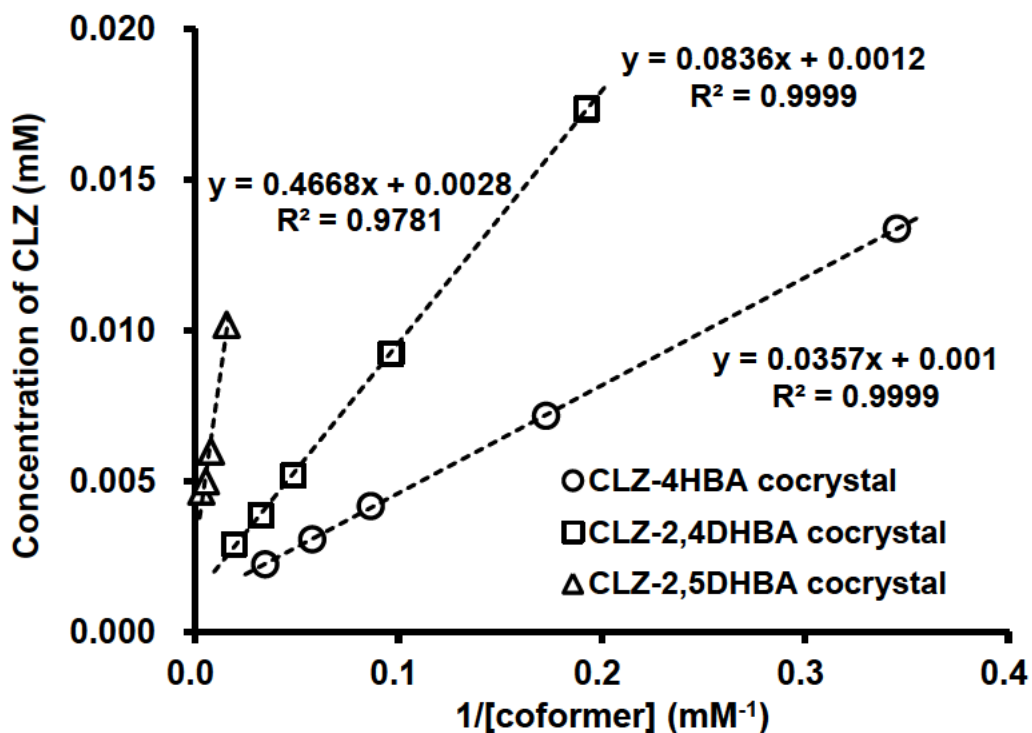


Figure 3-5. CLZ concentration in equilibrium with cocystals in SGF at 37 °C as a function of the inverse coformer concentration. The approximately linear equations, $y=ax+b$, and the correlation coefficients, R^2 , are expressed in the figure.

Table 3-4. The calculated solubility product, K_{sp} , and the solution complexation constant, K_{11} , in SGF.

Substance	CLZ-4HBA cocystal	CLZ-2,4DHBA cocystal	CLZ-2,5DHBA cocystal
Solubility product K_{sp} (M ²)	3.6×10^{-8}	8.4×10^{-8}	4.7×10^{-7}
Complexation constant K_{11} (M ⁻¹)	28.0	14.4	6.0

さらに K_{sp} と K_{11} を用いて Figure 3-6 に示す理論溶解度曲線を算出したところ、いずれの Cocrystal でも CLZ に比べて高い溶解度曲線を示した。Cocrystal の溶解度曲線と化学量論比で CLZ と Coformer が 1:1 で示される直線との交点が Cocrystal の溶解度として算出される。算出された Cocrystal の溶解度は CLZ に対して、CLZ-4HBA cocrystal で約 9.5 倍、CLZ-2,4DHBA cocrystal で約 14.5 倍、CLZ-2,5DHBA cocrystal で約 34.3 倍の溶解度上昇が示された。Cocrystal の溶解度は構成される Coformer の溶解度と平行になる傾向があると報告されており³⁹⁾、本章にて溶解度積から算出された Cocrystal の溶解度は Table 3-1 に示す Coformer の溶解度の序列 (2,5DHBA > 2,4DHBA > 4HBA) と相関性が高いことが確認された。また、Table 3-2 の熱力学的データから予測される溶解度とも一致しており、結晶格子エネルギーと溶解度積から算出された平衡溶解度は平行な傾向があるものと示唆された。

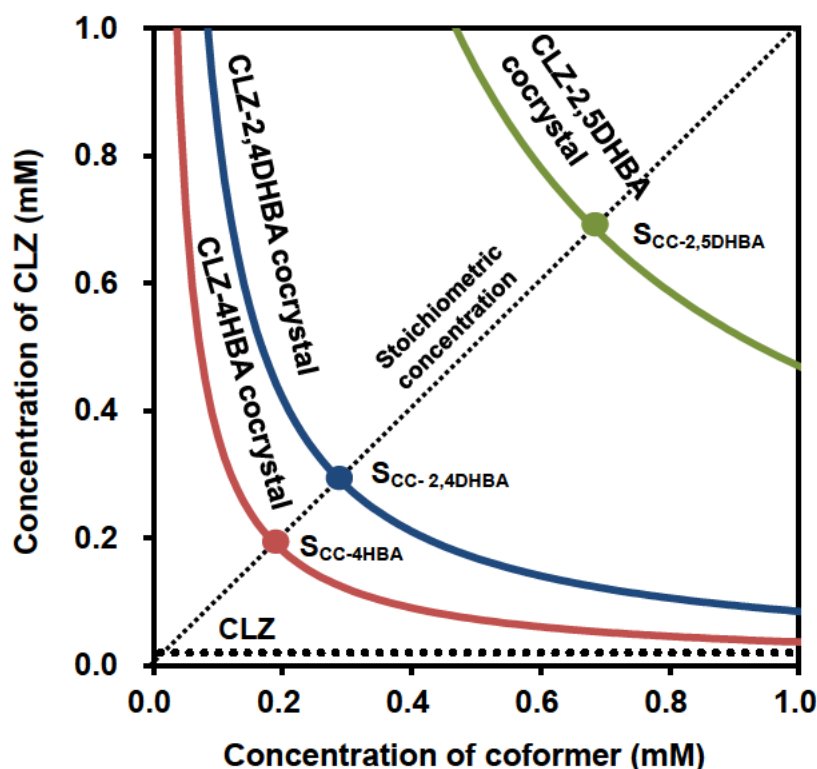


Figure 3-6. The calculated cocrystal solubilities as a function of coformer concentration. The solubilities of cocrystals, S_{CC} , are expressed as the intersection with the stoichiometric concentration line.

第3項 CLZ cocrystal の溶出試験と平衡溶解度との関係性

Slurry 法で得られた3種の Cocrystal はいずれも 50% 粒子径が 20 μm 程度であり, CLZ ハンマーミル原薬とほぼ類似である。ヒドロキシ安息香酸の位置異性体を Coformer として設計された各種 Cocrystal はそれぞれ固有の溶解度を示しており, 更に溶出試験における過飽和への影響を評価することで溶解度との関係性を検証することとした。試験液には SGF を使用し, CLZ は過飽和状態における再結晶化が著しく速いことが予め確認されていたため⁶³⁾, Cocrystal の過飽和を持続させるための基剤として Hypromellose を試験液に 1% 濃度で事前溶解して試験した。Hypromellose は再結晶化の阻害に効果的であり⁶⁴⁾, 一時的な過飽和の持続に非常に有効であることが期待される。得られた溶出試験結果は Figure 3-7-1 及び Figure 3-7-2 に示す。いずれの試験条件でも全ての Cocrystal で CLZ に比べて高い過飽和を示した。さらに興味深いことには, 溶解度の高い Cocrystal ほど再結晶化に伴う溶出低下が速く, 最も高い溶解度を示す CLZ-2,5DHBA cocrystal では他と比較して乏しい過飽和を示した。一方で, Cocrystal の中では CLZ に対する相対的溶解度上昇が低い CLZ-4HBA cocrystal で過飽和が最も持続する傾向が確認され, 溶解度積から算出された平衡溶解度と溶出試験における過飽和とは逆に相関することが確認された。なお, CLZ-2,5DHBA cocrystal では CLZ 濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件では試験開始初期の一時的な溶出立ち上がりさえも認められていない。

CLZ-2,5DHBA cocrystal は CLZ crystal に対する相対的な溶解度が高く, 粒子表面近傍での局所的過飽和度は極めて高いことが推測される。それ故, 結晶表面媒介転移に近い形で急速な安定晶生成を引き起こし (一部凝集を伴うかもしれない), 溶解速度に対して結晶化速度が速いことで過飽和が検出されないと考えられた⁶⁵⁾。対して, CLZ 濃度が 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件では CLZ-2,5DHBA cocrystal でも開始初期における一時的な溶出立ち上がりが確認された。これは系内の Cocrystal 粒子濃度の増加に伴って, 相対的な表面積が増加したことで見かけの溶解速度が上昇したためと考えられる。薬物粒子濃度の増加に伴う溶出濃度の立ち上がりは CLZ-4HBA cocrystal 及び CLZ-2,4DHBA cocrystal でも同様に見られており, この過剰な溶解は同時に過飽和濃度の速やかな低下を引き起こす要因にもなっている。この傾向は, 薬物が一時的に高い濃度で溶解することで一時的に過飽和度が急上昇し, それに伴って安定晶の CLZ 核生成速度が上昇したためと推察される⁶⁵⁾。ただし, CLZ-4HBA cocrystal では 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度条件でも 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃

度条件とほとんど変わらない過飽和持続を示している。CLZ-4HBA cocystal は溶解度積から算出された平衡溶解度が約 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度以上では一時的に溶解できる CLZ 濃度に制限がかかる。故に、適用する薬物量に関係なく過飽和度が一定程度に保たれ、再結晶化の進行が比較的緩慢となっている可能性が推察された。CLZ-4HBA cocystal の過飽和が最も持続する傾向も、この過剰溶解の回避によってもたらされており、溶解度と逆に相関する理由になっていると言える。

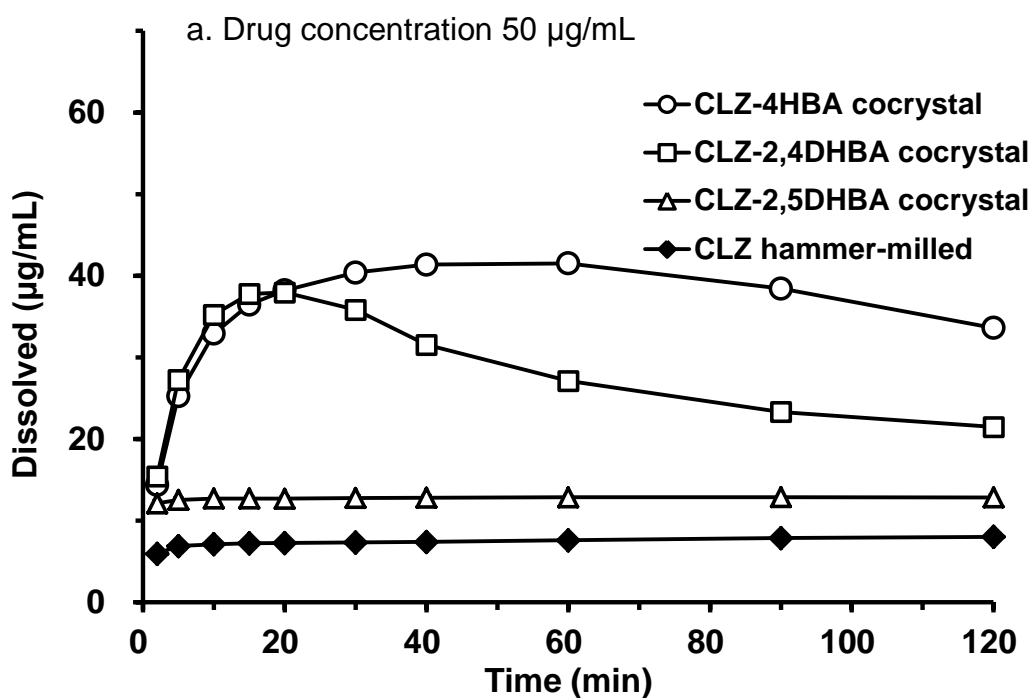


Figure 3-7-1. The dissolution profiles of CLZ substances in SGF containing 1% Hypromellose at 37 °C. The drug concentrations applied into the dissolution media are (a) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=3).

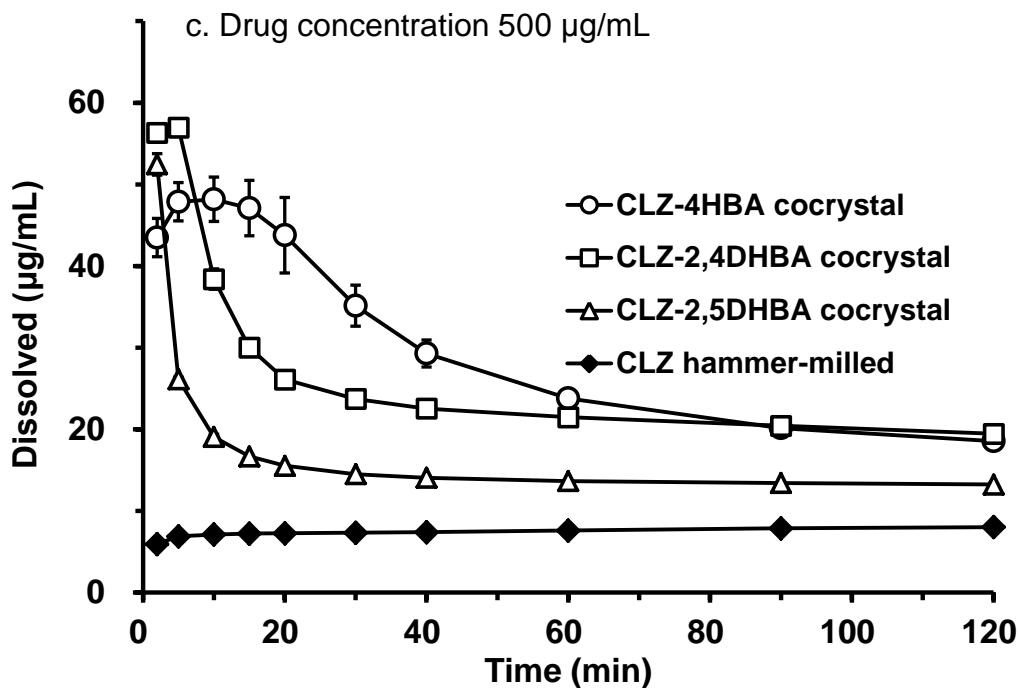
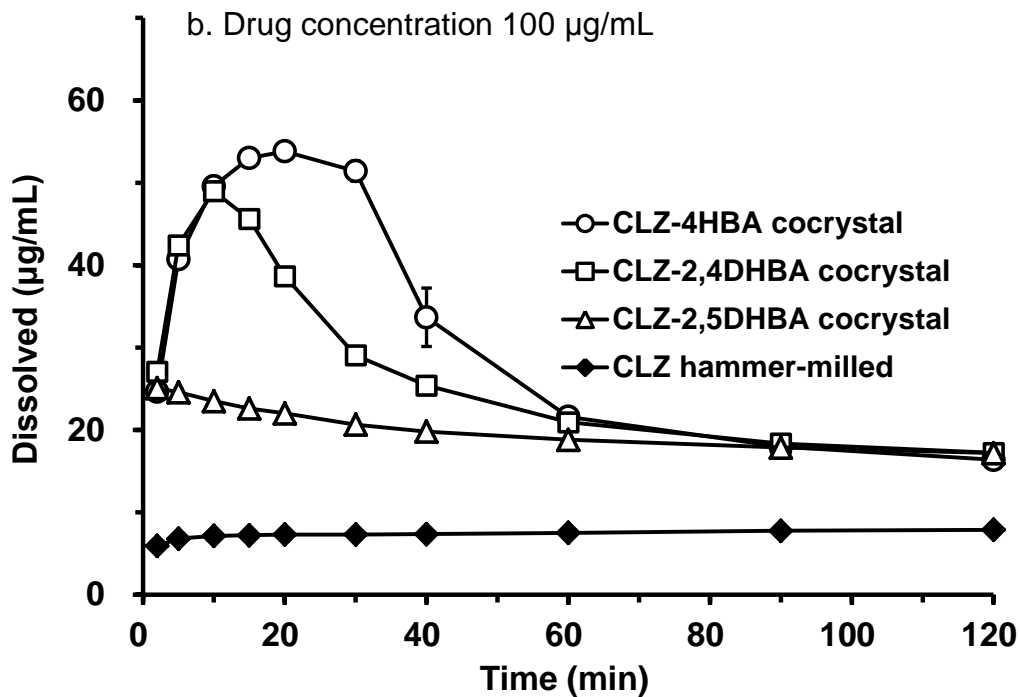


Figure 3-7-2. The dissolution profiles of CLZ substances in SGF containing 1% Hypromellose at 37 °C. The drug concentrations applied into the dissolution media are (b) 100 µg/mL and (c) 500 µg/mL. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=3).

第4項 CLZ cocrystal と非晶質固体分散体との溶出性の比較

CLZ cocrystal と CLZ-ASD の溶出比較を Figure 3-8 に示す。CLZ-ASD は CLZ cocrystal の溶出プロファイルとは異なり、溶出試験初期に著しく高い CLZ 濃度を検出した後に過飽和濃度は速やかに低下した。CLZ-ASD は非晶質状態であるが故に Gibbs 自由エネルギーは高い状態にあり⁴⁾、溶出試験液中において系内の安定化に向けて一時過飽和を伴った後に溶媒媒介転移によって安定晶への変換が速やかに起こったものと推察される。機構は高溶解性の Cocrystal に似ているが、非晶質薬物が Hypromellose とマトリクスを形成していることで表面媒介転移のような急速な結晶化は抑制されているのかもしれない。

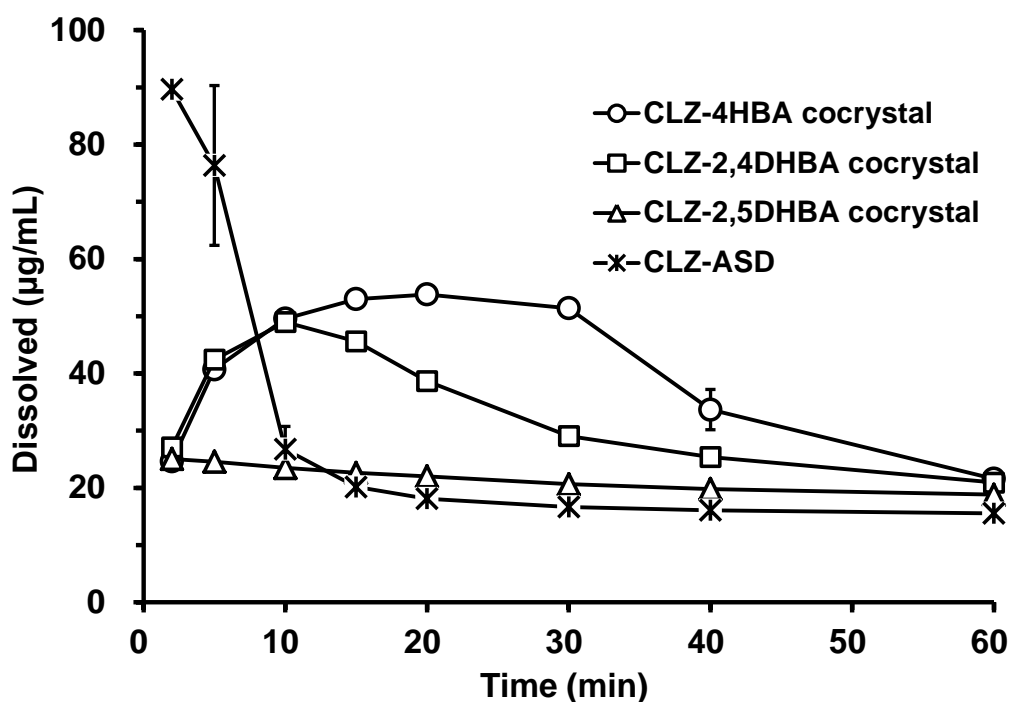


Figure 3-8. The dissolution profiles of CLZ cocrystals and CLZ-ASD in SGF containing 1% Hypromellose at 37 °C. The drug concentrations applied into the dissolution media are 100 µg/mL. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=3).

第5項 ビーグル犬を用いた CLZ cocrystal の経口吸収性の評価と *in vitro* 溶出試験における過飽和との関係性

イヌの経口吸収試験によって得られた PK パラメータと血清中 CLZ 濃度プロファイルを図 3-5 及び Figure 3-9 にそれぞれ示す。結果として、いずれの Cocrystal でもハンマーミル CLZ に対して有意に高い血中濃度プロファイルを示し、 C_{max} 比で CLZ-4HBA cocrystal は 7.7 倍、CLZ-2,4DHBA cocrystal は 3.2 倍、CLZ-2,5DHBA cocrystal は 2.0 倍高く、 AUC_{0-8h} 比で CLZ-4HBA cocrystal は 7.1 倍、CLZ-2,4DHBA cocrystal は 3.1 倍、CLZ-2,5DHBA cocrystal は 1.8 倍高い値を示した。また、経口吸収の改善効果は *in vitro* 溶出試験と高く相関しており、過飽和が最も持続した CLZ-4HBA cocrystal では CLZ に対して有意に高い BA を示す一方で、高い平衡溶解度を示すものの過飽和は乏しい CLZ-2,5DHBA cocrystal では低い BA 改善効果に留まった。

CLZ-ASD でも経口吸収性の改善が確認され、CLZ に対して C_{max} 比で 4.2 倍、 AUC_{0-8h} 比で 4.2 倍高い傾向が示された。CLZ-ASD は溶出試験にて一時的な溶出濃度が最も高いことが Figure 3-8 より確認されている。その反面、CLZ crystal への再結晶化も著しく、過飽和の持続は CLZ-4HBA cocrystal や CLZ-2,4DHBA cocrystal と比較すると長くない。Figure 3-9 の *in vivo* 試験結果を見ても、CLZ-4HBA cocrystal と比較すると BA は半分程度であり、溶出試験における過飽和持続が *in vivo* でも重要なファクターとなっていることを示している。ところが、CLZ-2,4DHBA cocrystal と比較すると CLZ-ASD は若干高い BA を示し、溶出試験における過飽和持続とは少し異なる結果が確認される。*in vitro* では閉鎖系で試験実施しているために、Cocrystal に含まれる CLZ や Coformer は常に一定の割合で維持されるのに対し、*in vivo* では CLZ や Coformer は消化管内で暴露された後、希釈や吸収を伴って変化する。Figure 3-6 に示した溶解度曲線によると、CLZ cocrystal は Coformer 濃度の変化に伴い、溶解度も連動して変化する特徴を有している。つまりは *in vivo* でも CLZ cocrystal の溶解度は消化管滞留と共に変動を伴い、過飽和度が変化することで閉鎖系の *in vitro* 試験結果とは少し差異が生じた結果となったと示唆される。故に、Cocrystal のような複合結晶のパフォーマンスをより厳密に評価するためには、Absorption sink を有するような *in vitro* 評価系がより適していると言えるのかもしれない。

Table 3-5. Pharmacokinetic parameters

Substance	CLZ -4HBA cocrystal	CLZ -2,4DHBA cocrystal	CLZ -2,5DHBA cocrystal	CLZ hammer -milled	CLZ -ASD
C_{\max}	2074±551 **	869±306	547±218	271±69	1143±184 **
$AUC_{0-8\text{ h}}$ (ng/mL·hr)	7624±1636 **	3384±1034 *	1989±708	1080±414	4514±1082 **
t_{\max} (hr)	1.1±0.6	2.0±0.8	1.5±0.6	1.5±0.6	1.5±0.6
$MRT_{0-8\text{ h}}$ (hr)	2.7±0.4	2.9±0.7	2.8±0.3	3.0±0.5	3.1±0.4

Results are expressed as the mean±S.D. (n=4).

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, compared to the corresponding parameters of the hammer-milled CLZ.

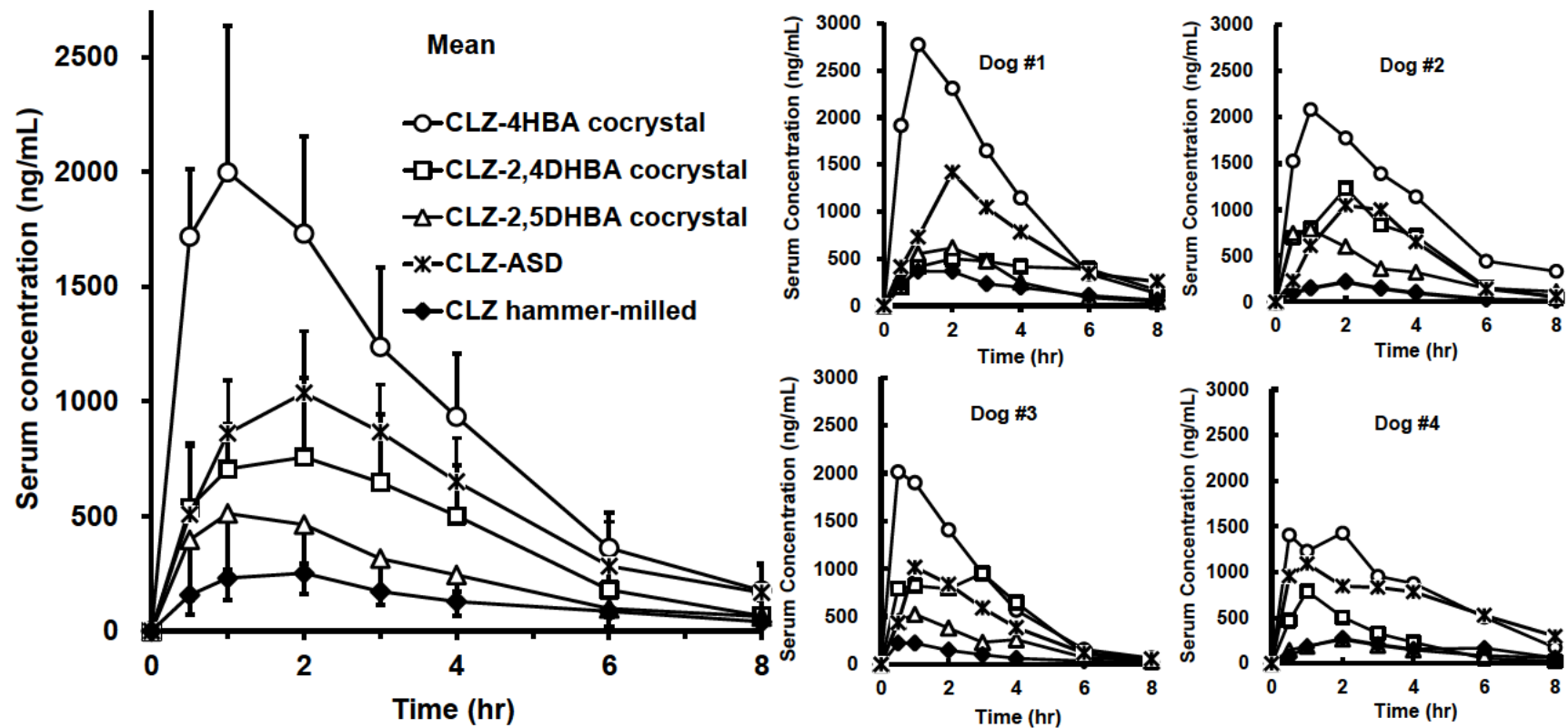


Figure 3-9. Serum concentration - time profiles of CLZ cocrystals, CLZ-ASD, and CLZ hammer-milled after an oral administration at a dose of 100 mg/body into fasted beagle dogs. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=4).

第6項 CLZ cocrystal の物理的安定性の評価

医薬品開発では原体の物理的安定性も非常に重要となる。実際に、第2章で示した CLZ/TC-5E 非晶質固体分散体は 60 °C 保管条件にて CLZ crystal への変換が確認された。本項では 3 種の CLZ cocrystal の物理的安定性を評価した。

Figure 3-10-1 及び Figure 3-10-2 には CLZ cocrystal の 40 °C 密封, 40 °C/75%RH 開封, 及び 60 °C 密封状態で 2 週間保管することによる PXRD パターンの変化を示す。CLZ-4HBA cocrystal 及び CLZ-2,4DHBA cocrystal ではいずれの条件でも PXRD パターンの変化は認められず, 物理的安定性が高いことが示された。対して, CLZ-2,5DHBA cocrystal では 40 °C 密封, 60 °C 密封では PXRD パターンの変化は認められないものの, 40 °C/75%RH 開封条件にて PXRD パターン変化が認められた。

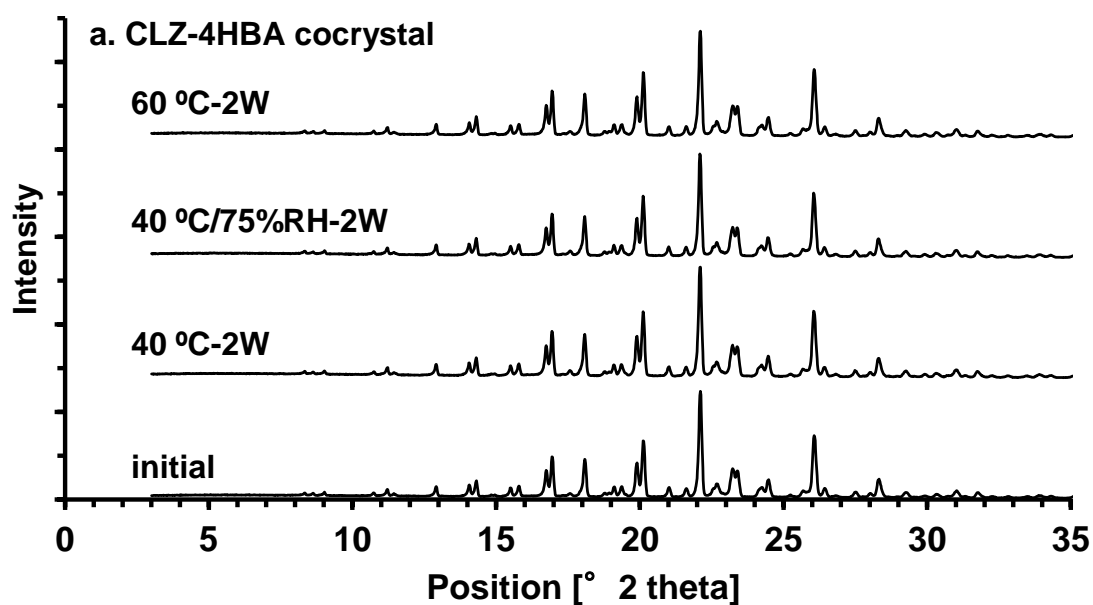


Figure 3-10-1. PXRD patterns of (a) CLZ-4HBA cocrystal. Below pattern, second pattern from the bottom, third pattern from the bottom, and upper pattern in the graph represent the initial powder, the powder stored for 2 weeks at 40 °C in a glass vial, the powder disclosed for 2 weeks at 40 °C /75%RH, and the powder stored for 2 weeks at 60 °C in a glass vial, respectively.

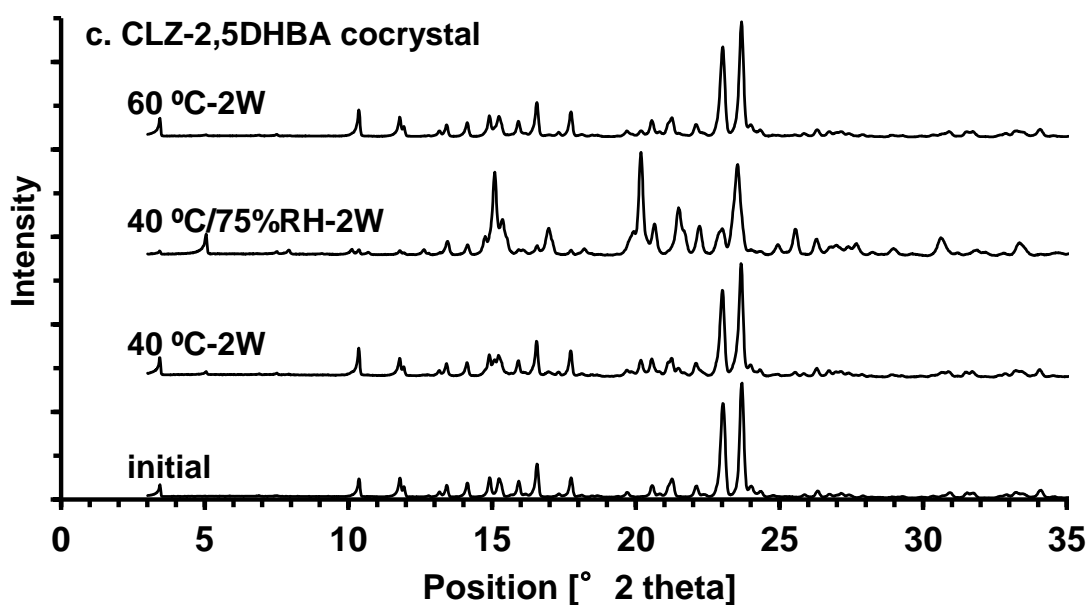
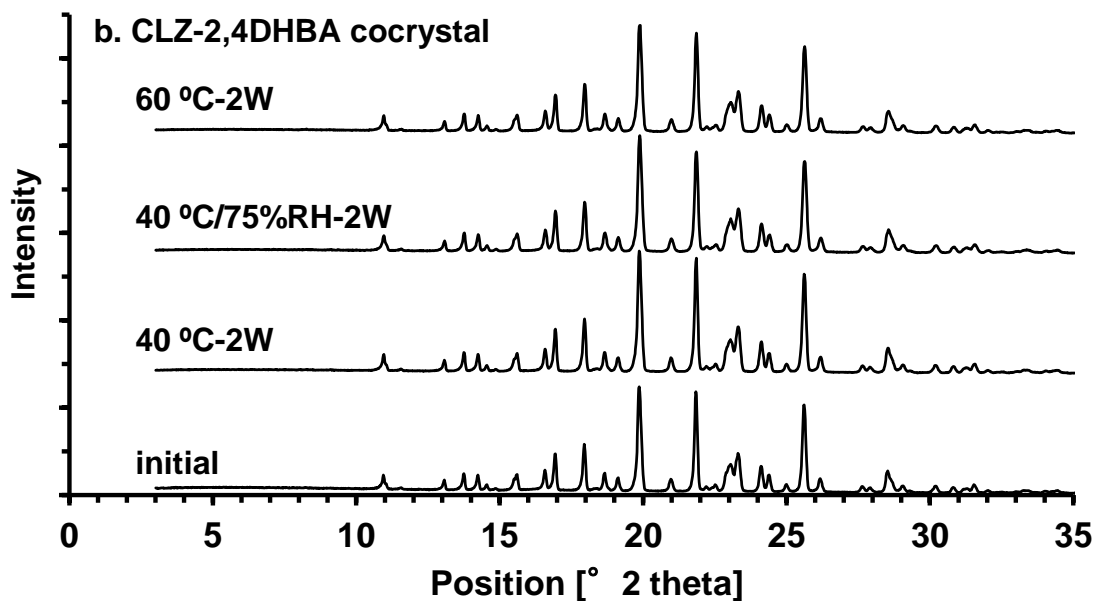


Figure 3-10-2. PXRD patterns of (b) CLZ-2,4DHBA cocrystal and (c) CLZ-2,5DHBA cocrystal. Below pattern, second pattern from the bottom, third pattern from the bottom, and upper pattern in each graph represent the initial powder, the powder stored for 2 weeks at 40 °C in a glass vial, the powder disclosed for 2 weeks at 40 °C /75%RH, and the powder stored for 2 weeks at 60 °C in a glass vial, respectively.

CLZ-2,5DHBA cocrystal の 40 °C/75%RH 開封条件における PXRD パターンは CLZ crystal 固有のピークとも一致しないため、高湿度条件に伴う水和物の可能性が疑われた。そこで、40 °C/75%RH 開封条件で CLZ-2,5DHBA single cocrystal を精製し、X-ray diffraction によってその結晶構造の解析を試みた。Figure 3-11 には 40 °C/75%RH 開封条件で認められた CLZ-2,5DHBA cocrystal と、類似の条件で個別に精製した CLZ-2,5DHBA single cocrystal との XRD パターンの比較を示す。結果として両者の XRD パターンは一致することが確認された。Figure 3-12 には結晶構造解析により導き出された結晶パッキングの一部、Table 3-6 には結晶学的解析データを示す。第 2 章の Figure 2-12-2 に示す CLZ-2,5DHBA cocrystal と比較して、CLZ のカルボスチリル骨格カルボニル基と 2,5DHBA のカルボキシル基との間に水分子が含まれており ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}\cdots\text{HO}-\text{C}$)、更にこの水分子の一方の水素はオルト位の水酸基の酸素原子と水素結合を伴っていることが確認された ($\text{HO}-\text{H}\cdots\text{O}-\text{C}$)。CLZ のカルボスチリル骨格同志の 2 分子間水素結合、及び CLZ のテトラゾール骨格アミンと 2,5DHBA のメタ位水酸基 ($\text{N}\cdots\text{HO}-\text{C}$) との水素結合は無水物と同様に認められた。結晶学的解析データの結果からも、40 °C/75%RH 開封条件で精製された結晶は化学量論比 1:1:1 の CLZ-2,5DHBA cocrystal の水和物であることが確認された。この水和物は CLZ と 2,5DHBA との間に楔のように水分子が入り込んでおり、高湿度条件で容易に固相変換すると考えられる。このような楔型水和物の固相変換は非常に興味深い機構であると同時に、水相中でもこのような無水物から水和物への変換が生じている可能性が高く、Figure 3-7-1 や Figure 3-7-2 に示す CLZ-2,5DHBA cocrystal の特徴的な溶出挙動にも影響している可能性が高いものと示唆された。

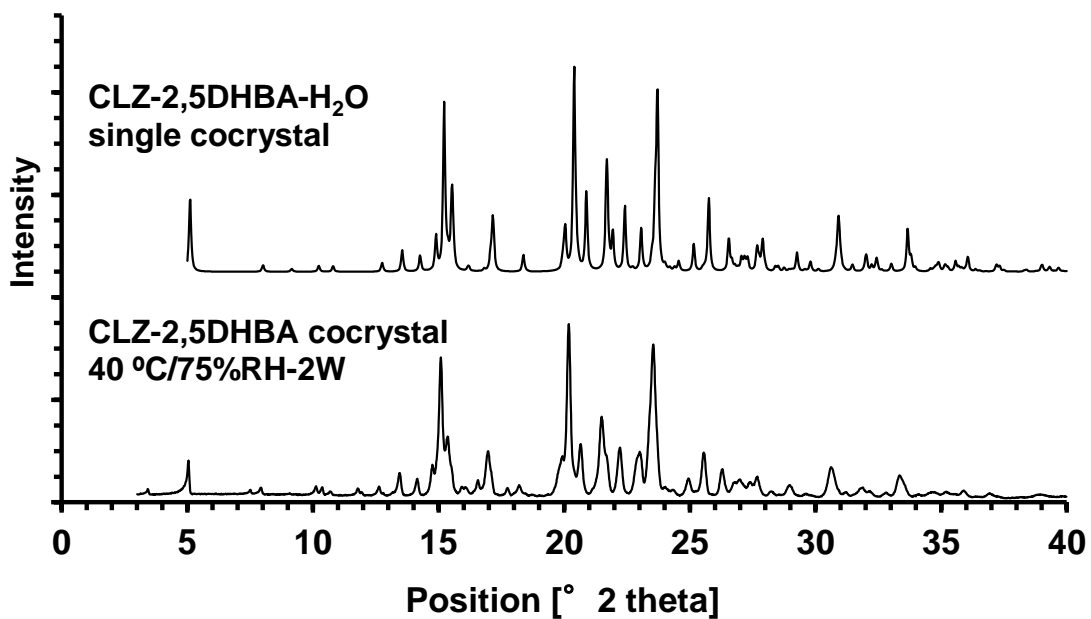


Figure 3-11. XRD patterns of CLZ-2,5DHBA cocrystal disclosed at 40 °C/75%RH and CLZ-2,5DHBA-H₂O single cocrystal.



Figure 3-12. Fragments of the crystal structures of CLZ-2,5DHBA-H₂O cocrystal. H-bond interactions are represented as dashed lines.

Table 3-6. Crystallographic data for CLZ-2,5DHBA cocrystals

Substance	CLZ-2,5DHBA cocrystal	CLZ-2,5DHBA-H ₂ O cocrystal
Formula	C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₂ ·C ₇ H ₆ O ₄	C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₂ ·C ₇ H ₆ O ₄ ·H ₂ O
Formula weight	523.59	541.60
Crystal system	monoclinic	monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
<i>a</i> (Å)	9.8623(3)	6.64769(19)
<i>b</i> (Å)	12.2726(5)	34.5529(11)
<i>c</i> (Å)	21.4036(7)	11.6315(4)
α (deg)	90	90
β (deg)	103.442(7)	90.215(6)
γ (deg)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	2519.66(17)	2671.71(15)
<i>Z</i>	4	4
<i>D</i> _{cal} (g·cm ⁻³)	1.380	1.346
μ (mm ⁻¹)	9.90	9.84
<i>F</i> (000)	1112	1152
2 θ max (deg)	55	55
Reflections collected	21465	21190
Independent reflections, <i>R</i> _{int}	5735, 0.0400	5899, 0.0417
<i>R</i> ₁ (<i>I</i> > 2.00 σ (<i>I</i>))	0.0420	0.0408
<i>R</i> (all reflections)	0.0649	0.0632
w <i>R</i> ₂ (all reflections)	0.0960	0.0988
$\Delta\rho_{\max}$, $\Delta\rho_{\min}$ (eÅ ⁻³)	0.31, -0.24	0.29, -0.23

第4節 小括

難溶解性薬物 CLZ の経口吸収性の改善を目的として、4HBA、2,4DHBA、及び 2,5DHBA との Cocrystal を Slurry 法にて調製した。用いた Coformer はヒドロキシ安息香酸の位置異性体であり、いずれの Cocrystal も CLZ に対する溶解度上昇が確認されると共に、類似の Coformer を用いたとしても、その溶解特性はそれぞれ固有の値を示すことが確認された。特に、CLZ-2,5DHBA cocrystal は複数の水素結合による Cocrystal 形成が結晶構造解析から確認されたにも関わらず、熱力学的解析結果からも結晶格子の強度が低く、溶解度積の溶解度も極めて高いことが示された。

in vitro 溶出試験を実施したところ、Cocrystal 化に伴う過飽和持続は溶解度と逆に相関する傾向があり、高い溶解度を示す CLZ-2,5DHBA cocrystal は過飽和が乏しい傾向が示された。一方で、Cocrystal の中では CLZ に対する溶解度上昇が比較的マイルドであった CLZ-4HBA cocrystal にて過飽和が最も持続することが確認された。溶解度の最大化が期待される CLZ-ASD では溶出試験初期にて一時的に高い過飽和濃度を示し、その後急激に溶出低下した。この結果は溶解度の上昇が必ずしも過飽和持続に繋がらないことを裏付ける結果となっていると考えられた。

in vivo 吸収試験をイヌで実施したところ、溶出試験の過飽和持続性とほぼ相関する傾向が確認され、特に CLZ-4HBA cocrystal では CLZ crystal に比べて AUC_{0-8h} 比で 7.1 倍と高い吸収改善効果を示し、非晶質固体分散体の BA も大きく超えることが示された。このように、難溶解性化合物における Cocrystal 化は低い BA の解決手段として非常に有効であることが検証されたと同時に、CLZ のように再結晶化の速やかな難水溶性化合物では、Cocrystal 化による溶解度の最大化が必ずしも高いパフォーマンスを示す訳ではなく、むしろ過剰に上昇する過飽和度によって吸収改善効果に制限がかかる可能性も示唆された。

CLZ cocrystal の物理的安定性を評価したところ、CLZ-4HBA cocrystal 及び CLZ-2,4DHBA cocrystal は 40 °C 密封、40 °C /75%RH 開封、60 °C 密封いずれの条件でも結晶形の変化なく安定であることが確認された。CLZ-2,5DHBA cocrystal は 40 °C/75%RH 開封条件にて水和物への変換が確認された。

第4章 溶解特性の異なる CLZ cocrystal の過飽和制御

第1節 諸言

前章にて CLZ cocrystal の溶解度は過飽和持続性とは逆に相関する傾向にあり、著しく高い溶解性はむしろ BA に制限がかかることを報告した。一般的に Cocrystal は水素結合によって構成されており、塩のようなイオン結合と比べると弱い力で引き合っていることから、塩よりも解離が速いことが知られている⁴⁾。溶解性の高い Cocrystal では解離がなお一層顕著に進み、過剰に溶解することで、それが再結晶化のトリガーとなることが示唆される。非晶質固体分散体のような高い過飽和溶解性を伴う研究では、溶液媒介転移による再結晶化だけでなく、その著しい結晶化速度のために溶液との表面コンタクトに伴って瞬間的に安定晶へ変換が起こる表面媒介転移も報告されている^{65,66)}。高い溶解性を示す塩でも表面媒介転移によって結晶化を伴う事例が報告されており⁶⁷⁾、解離の速い Cocrystal ではなお更このような再結晶化機構が考えられる。前章でも溶解度の高い CLZ-2,5DHBA cocrystal にて表面媒介転移が疑わしい溶出挙動を示すことも確認されている。表面媒介転移を克服して高い過飽和を発揮させるには、表面での結晶化速度を上回る溶解速度を確保する必要がある⁶⁵⁾。Noyes-Whitney equation によると、溶解速度は溶解度と粒子径（比表面積）に依存する⁶⁸⁾。つまりは表面媒介転移を起こす Cocrystal は、微細化によって溶解速度を引き上げ、再結晶化速度を克服することで過飽和を引き上げられる可能性を秘めていると言える。前章にて、過剰に高い溶解度は再結晶化を促すとした一方で、表面媒介転移の克服には溶解速度を更に上げる必要があるということは、Cocrystal の溶解特性に応じた原体設計が必要になる可能性も示唆しているのかもしれない。

また、Cocrystal の溶解特性を議論する上で、Figure 4-1 に示す Drug または Coformer と Cocrystal との共晶点（Transition point, C_r または Eutectic point, C_{eu} ）の把握は非常に重要である^{39,69,70)}。Cocrystal 濃度の上昇に伴い Ligand (Coformer) 濃度が Eutectic point に近づくと Cocrystal と Drug との溶解度差が縮小されていき、更には Eutectic point を超えると Cocrystal の方が Host crystal よりも安定となる。これは Coformer を共通イオンとして Cocrystal に付加することで、Host crystal への急速な再結晶化を抑制できる可能性を示唆しており、実際に共通イオン効果を利用して高溶解性の Cocrystal の結晶化・沈殿

を抑制するといった報告もある⁷¹⁾。本章ではこの Coformer による共通イオン効果を利用した製剤設計の可能性と Eutectic point を考慮した Cocrystal 設計に関して検討・考察することとした。

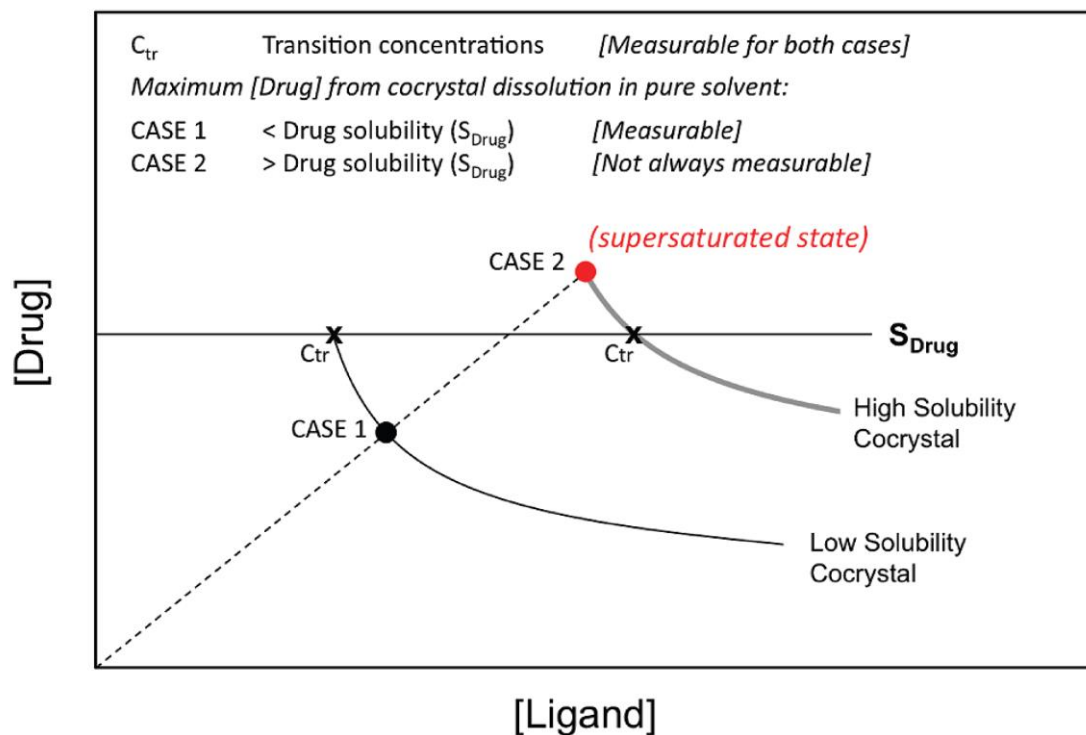


Figure 4-1. Schematic phase solubility diagram and the transition points of two different cocrystals based on the K_{sp} of a stable (case 1) or metastable (case 2) cocrystal.³⁹⁾

第2節 実験試料及び方法

第1項 実験試料

CLZ cocrystal は第3章で Slurry 法にて精製した結晶末を使用した。共通イオンとして使用した 4HBA 及び 2,5DHBA は第2章で示した試薬グレードを使用した。溶出試験で使用した添加剤は第3章に示したものを使用した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社（大阪）の試薬グレードを使用した。

第2項 実験方法

1. CLZ cocrystal の微粉碎

CLZ cocrystal のジェットミル (JM) は A-O Jet Mill (株式会社セイシン企業, 東京) を用いて粉碎圧 0.4 MPa の条件で実施した (以下, 微粉碎した CLZ cocrystal はそれぞれ, CLZ-4HBA cocrystal-JM 及び CLZ-2,5DHBA cocrystal-JM と示す)。

2. 溶出試験

撥水性を有する CLZ 原末の溶出試験における速やかな分散を促すために, 乳糖と軽質無水ケイ酸を 49:1 の比率で混合した混合末を用いて, 試料サンプルに対して質量比で 4 倍量加えて事前に混合した。試験液は 1% Hypromellose を含む SGF とし, 共通イオンを付加する場合は, 試験する CLZ cocrystal に対応する Coformer (4HBA または 2,5DHBA) を 0.003% (30 µg/mL) または 0.03% (300 µg/mL) 添加して事前に溶解させた。溶出試験は上記の試験液を 100 mL 分取し, 液温度を 37±1 °C で維持させて, 攪拌速度 500 rpm の条件で実施した。試験薬物用量は 10 mg で実施し, 試験開始から所定のタイムプログラムで 1~2 mL ずつサンプリングし, 0.22 µm のフィルターでろ過して第3章の第2項に示す方法に基づいて HPLC にて定量した。

4. その他の実験

第3章に示す方法と同様に測定した。

第3節 実験結果及び考察

第1項 CLZ cocrystal の微粉碎による溶出性及び経口吸収性への影響

CLZ cocrystal 微粉碎末の SEM 写真を Figure 4-2, 粒度分布を Figure 4-3 に示す。ジェットミルされることで平均粒子径 3~5 μm 程度まで微細化されていることが確認された。

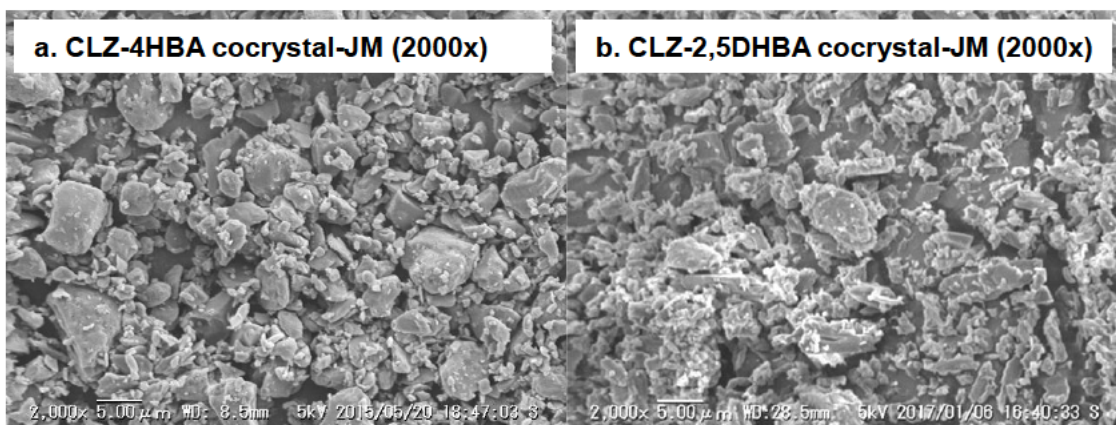


Figure 4-2. SEM images of CLZ cocrystals jet-milled. (a) represents CLZ-4HBA cocrystal, (b) represents CLZ-2,5DHBA cocrystal.

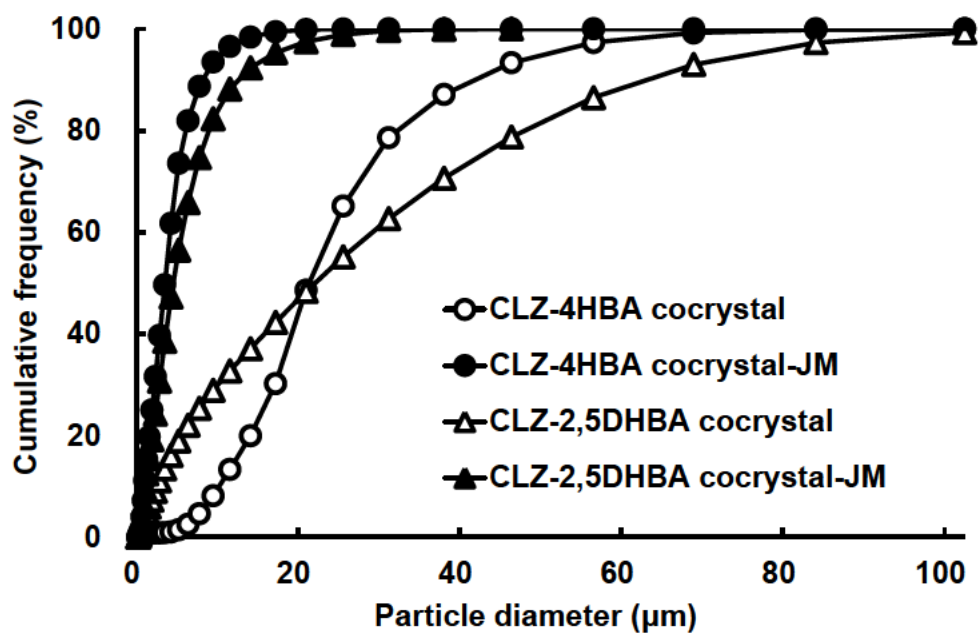


Figure 4-3. Particle size distributions of CLZ cocrystals jet-milled and unmilled.

Figure 4-4 には Slurry 法にて精製された Cocrystal とそのジェットミル処理末の溶出試験結果を示す。CLZ-4HBA cocrystal では、微粉碎化に伴って上昇した比表面積により、CLZ 濃度が溶出 5 分以内に Cocrystal の平衡溶解度（約 70 $\mu\text{g/mL}$ ）付近まで上昇した後、再結晶化に伴って速やかに溶出低下した。この結果は溶解速度が再結晶化のトリガーとなっていることを示唆していると考えられる。CLZ-2,5DHBA cocrystal では未粉碎結晶では初期溶出濃度の立ち上がりがほとんど検出されなかったのに対し、微粉碎することで溶出濃度の上昇が確認された。ただし、微粉碎に伴う初期溶出の上昇効果は予想よりも小さく、CLZ-2,5DHBA cocrystal の本来の溶解度から推察すると、Cocrystal のポテンシャルがまだ十分に発揮されていない可能性も十分に考えられた。

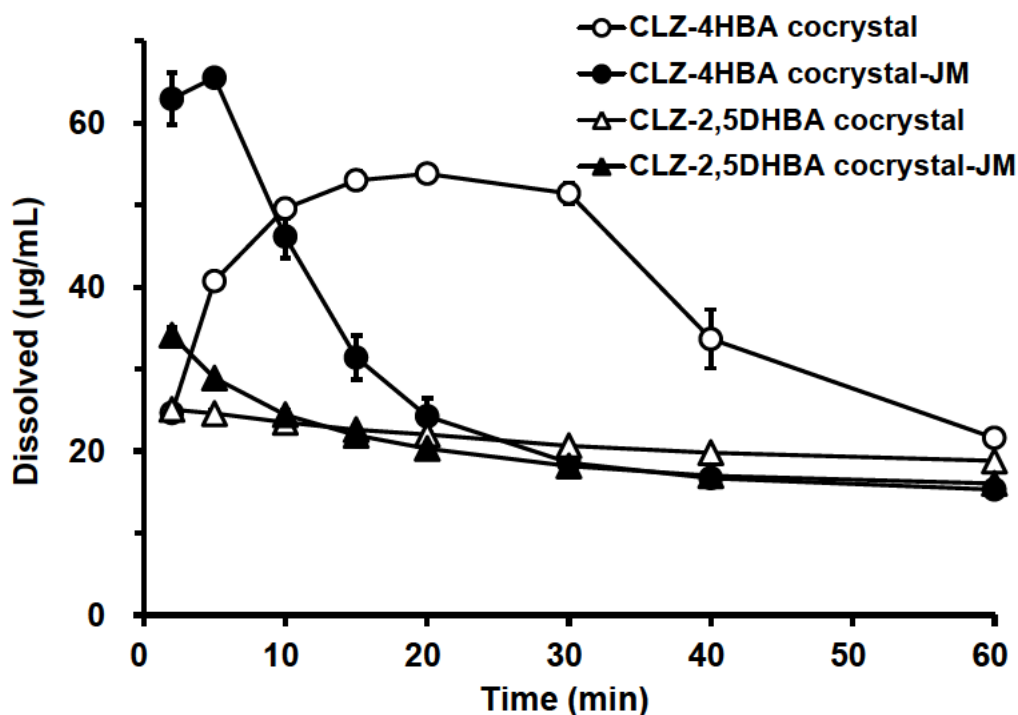


Figure 4-4. The dissolution profiles of CLZ substances in SGF containing 1% Hypromellose at 37 °C. The drug concentration applied into the dissolution media is 100 $\mu\text{g/mL}$. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=3).

Cocrystal の溶出特性に対する粒子径の影響を評価した研究では、溶出性が粒子径の影響を受ける結果が示された一方で、粒子径の影響をほとんど受けない Cocrystal も報告されている⁷²⁾。この原因に関して筆者らは、粒子径の影響よりも安定晶への変換の影響の方が大きいのか、あるいは溶出試験過程における溶解または凝集によって粒子径が変化することで粒子径の効果が認められていないものと考えしており⁷²⁾、CLZ-2,5DHBA cocrystal でも類似の機構が影響したことで微粉碎の効果に制限がかかった可能性もあり得るかもしれない。

イヌの経口吸収試験によって得られた PK パラメータと血清中 CLZ 濃度プロファイルを図 4-1 及び Figure 4-5 にそれぞれ示す。CLZ-4HBA cocrystal 及び CLZ-2,5DHBA 共に、微粉碎化 (JM) に伴う C_{max} 及び AUC に対する有意な影響は認められなかった。一方、平均値ベースでは、CLZ-4HBA cocrystal-JM は粉碎前原末と比べて C_{max} 比で 1.2 倍と微増し、 AUC_{0-8h} 比で 0.9 倍と若干低下した。特に、微粉碎によって S.D. が著しく上昇しており、個体間で吸収にバラツキが生じていることが確認された。これは、Figure 4-4 に示した微粉碎化に伴う過飽和持続性の低下が *in vivo* でも影響し、個体の消化管内の環境に応じて結晶化の進行にバラツキが生じた結果であると示唆された。同様に、CLZ-2,5DHBA cocrystal では、平均値ベースで微粉碎化によって C_{max} 比で 2.4 倍、 AUC_{0-8h} 比で 1.2 倍の吸収の上昇が確認された。表面媒介転移による過飽和不良が微粉碎に伴って改善されたことによるものと考えられるが、仮に非晶質固体分散体のように表面媒介転移を伴わない製剤設計ができれば吸収性を更に引き上げられる余地があることを示唆しているとも考えられる。

Table 4-1. Pharmacokinetic parameters.

Substance	CLZ-4HBA cocrystal	CLZ-4HBA cocrystal-JM	CLZ-2,5DHBA cocrystal	CLZ-2,5DHBA cocrystal-JM
C_{max}	2074±551	2412±1631	547±218	1314±736
AUC_{0-8h} (ng/mL·hr)	7624±1636	6899±5002	1989±708	2468±1262
t_{max} (hr)	1.1±0.6	1.3±0.5	1.5±0.6	1.0±0.7
MRT_{0-8h} (hr)	2.7±0.4	2.2±0.2	2.8±0.3	2.6±0.3

Results are expressed as the mean±S.D. (n=4).

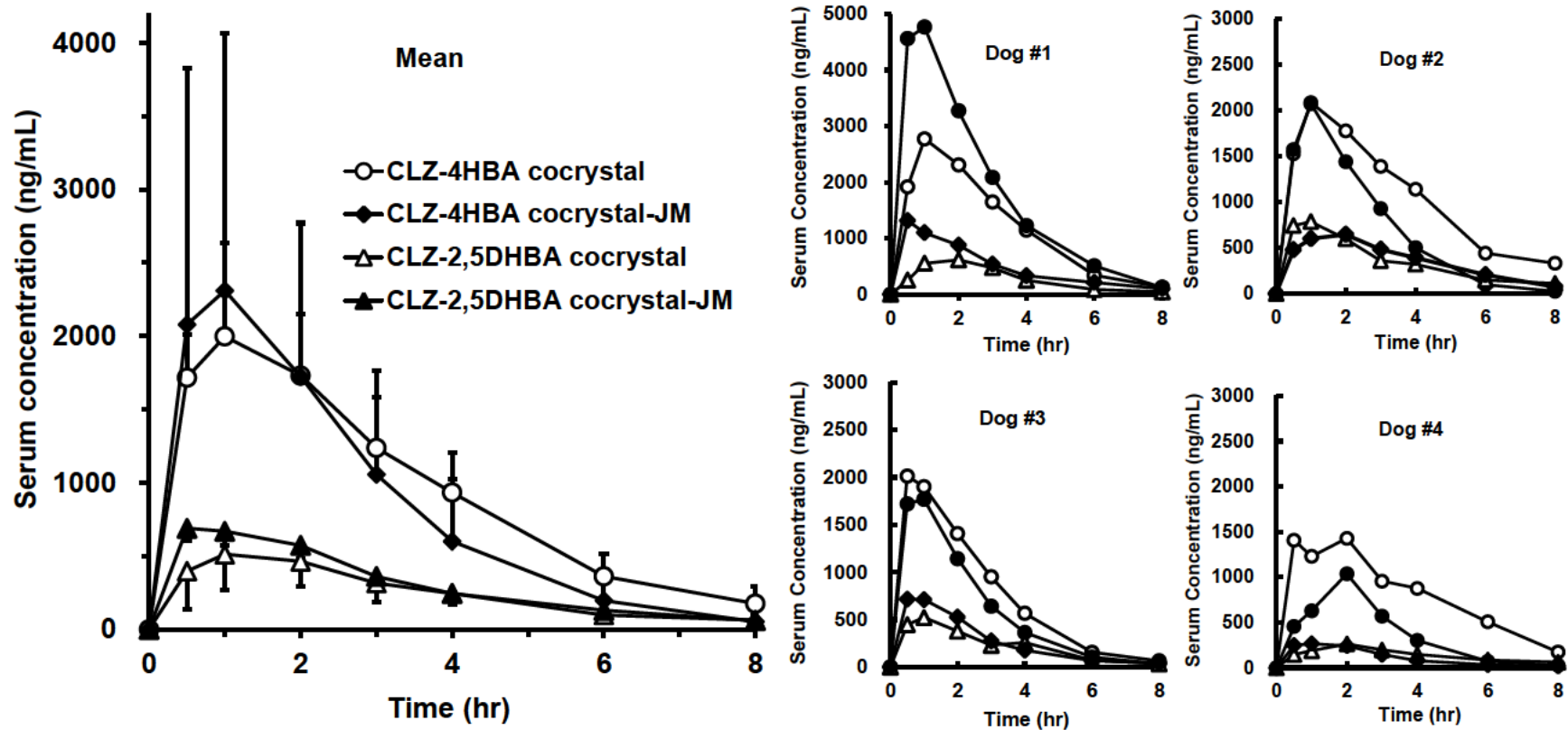


Figure 4-5. Serum concentration - time profiles of CLZ cocrystals un-milled and jet-milled after an oral administration at a dose of 100 mg/body into fasted beagle dogs. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=4).

第2項 CLZ cocrystal の共通イオン効果を利用した過飽和制御

CLZ-4HBA cocrystal-JM を対象として、溶出試験液に共通イオンとして 4HBA を 30 $\mu\text{g/mL}$ (0.003%) 濃度で付加することによる溶出性への影響を評価し、結果を Figure 4-6-1 に示す。一時的な過飽和濃度と共に、速やかな過飽和濃度の低下が確認されていた CLZ-4HBA cocrystal-JM は、共通イオンが付加されることで初期溶出の抑制と持続的な過飽和が検出された。これは系内の共通イオン濃度が上昇することで、溶解度積によって見かけの溶解度が低下し、CLZ-4HBA cocrystal の過剰な溶解が制限されたことで過飽和が持続したものと示唆された。

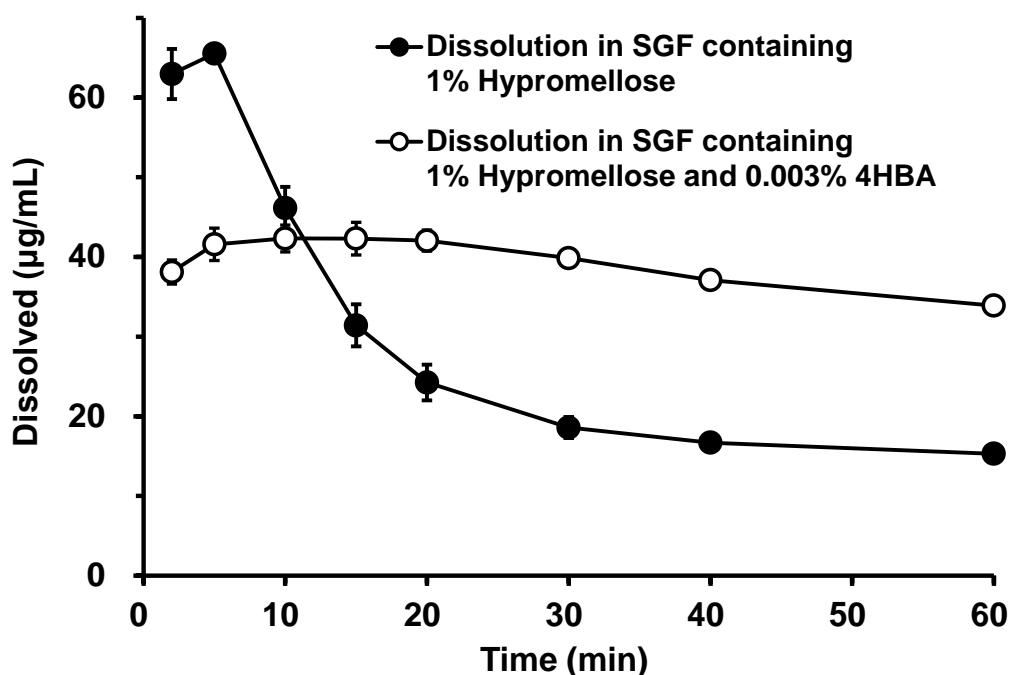


Figure 4-6-1. Dissolution profiles of CLZ-4HBA cocrystal-JM in SGF containing 1% Hypromellose or that additionally containing 0.003% 4HBA at 37 °C. The drug concentration applied into the dissolution media is 100 $\mu\text{g/mL}$. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=3).

更に、CLZ-2,5DHBA cocrystal-JM を対象として同様の溶出試験を実施し、結果を Figure 4-6-2 に示す。共通イオンとして使用した 2,5DHBA は、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.003%) の濃度条件に加えて、CLZ-2,5DHBA cocrystal が極めて高い溶解性を示すことから一層の共通イオン効果付与のために、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.03%) の高濃度条件で試験した。2,5DHBA が 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度では、未添加の試験と比較して溶出プロファイルの差はほとんど認められなかった。対して、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度では、初期の過飽和濃度には差がないものの、その後の過飽和持続にはポジティブな影響が示された。結果として、CLZ-2,5DHBA cocrystal-JM でも共通イオンを付加することによる過飽和持続へのアドバンテージは認められるものの、初期の過飽和濃度を上昇させる効果には乏しいことが示された。

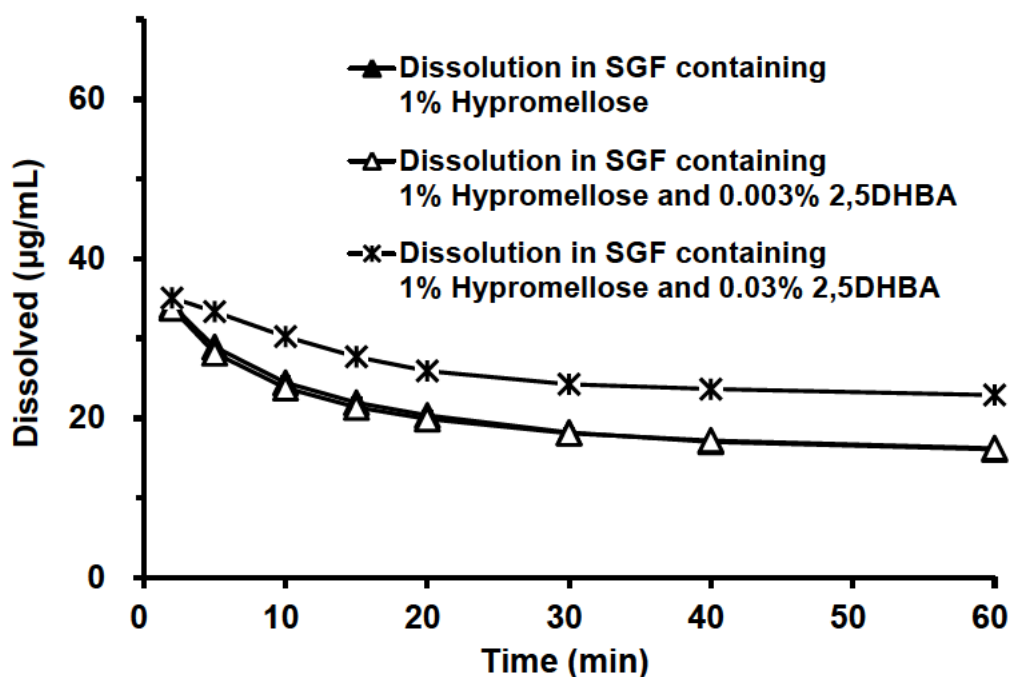


Figure 4-6-2. Dissolution profiles of CLZ-2,5DHBA cocrystal-JM in SGF containing 1% Hypromellose or that additionally containing 0.003% or 0.03% 2,5DHBA at 37 °C. The drug concentration applied into the dissolution media is 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=3).

Figure 4-6-1 及び Figure 4-6-2 の結果を受けて、Figure 4-7-1 及び Figure 4-7-2 には CLZ-4HBA cocrystal 及び CLZ-2,5DHBA cocrystal における理論溶解度曲線と共通イオンの付加による見かけの溶解度、及び Eutectic point をそれぞれ示す。CLZ-4HBA cocrystal では、化学量論比 1:1 の Cocrystal が SGF 中にて溶解が進行していくと、 $S_{1CC-4HBA}$ に示す濃度まで上昇する。この濃度は CLZ-4HBA cocrystal の溶解度として約 70.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出される。対して、4HBA を 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で付加することで、化学量論比 1:1 の CLZ-4HBA cocrystal の溶解直線はその分平行シフトする。この直線溶解度曲線との交点 $S_{2CC-4HBA}$ は約 40.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出され、見かけの溶解度が低減することが確認される。実際に、Figure 4-6-1 における 4HBA を付加した溶出試験の最大 CLZ 溶解濃度は $S_{2CC-4HBA}$ 付近であることが確認され、過飽和濃度はほぼ見かけの溶解度付近に制御されていることが示された。

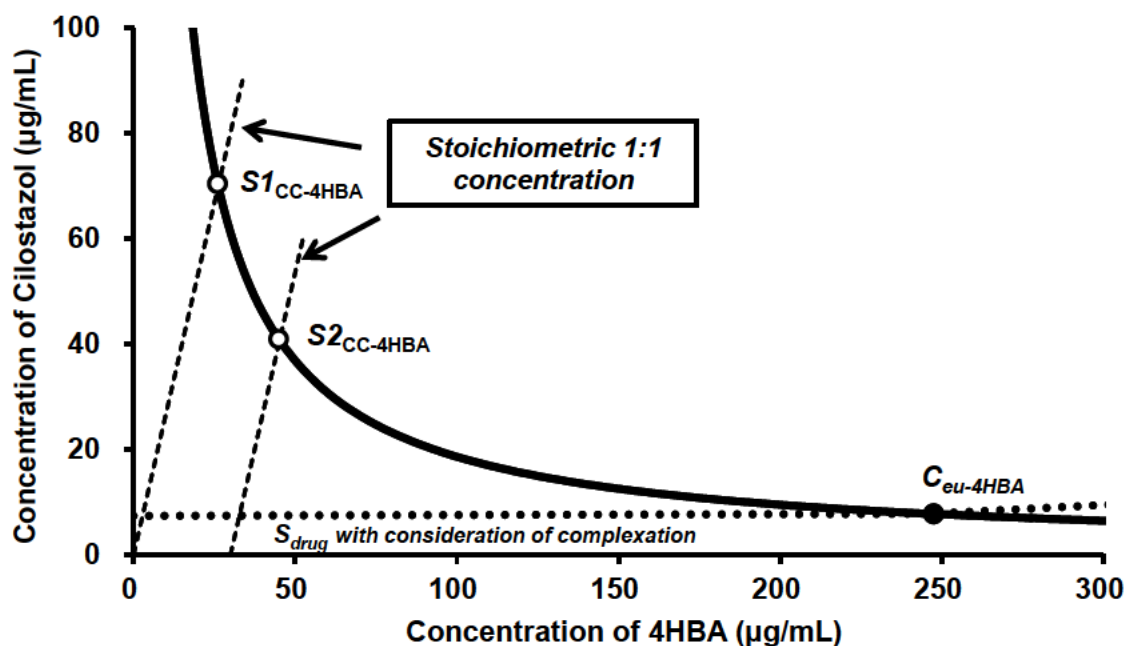


Figure 4-7-1. The phase solubility diagram of CLZ-4HBA cocrystal. Open circles represent the solubility of the cocrystal in SGF, $S_{1CC-4HBA}$, and the solubility of the cocrystal in SGF containing 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 4HBA, $S_{2CC-4HBA}$, respectively. Closed circle represents the eutectic point, $C_{eu-4HBA}$.

CLZ-2,5DHBA cocrystal においても同様の算出を行い、理論溶解度曲線と共通イオンの付加による見かけの溶解度、及び Eutectic point を Figure 4-7-2 に示す。CLZ-2,5DHBA cocrystal の溶解度 $S1_{CC-2,5DHBA}$ は約 253.0 $\mu\text{g/mL}$ であるのに対し、2,5DHBA を 30 $\mu\text{g/mL}$ 付加した時の見かけの溶解度 $S2_{CC-2,5DHBA}$ は約 219.6 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$ 付加した時の見かけの溶解度 $S3_{CC-2,5DHBA}$ は約 80.7 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。Figure 4-6-2 によると、2,5DHBA を 30 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で付加した条件では過飽和濃度プロファイルにほとんど変化がなく、300 $\mu\text{g/mL}$ 濃度まで付加することで過飽和持続に一定の効果を示すことが確認された。Figure 4-7-2 によると、30 $\mu\text{g/mL}$ の付加条件では見かけの溶解度にほとんど差がないのに対し、300 $\mu\text{g/mL}$ の付加条件では見かけの溶解度が 1/3 程度まで低減されていることから、CLZ-2,5DHBA cocrystal でも共通イオンによる溶解制御と、過剰な溶解を制限することによる過飽和持続へのポジティブな効果が検証されたものと推察された。

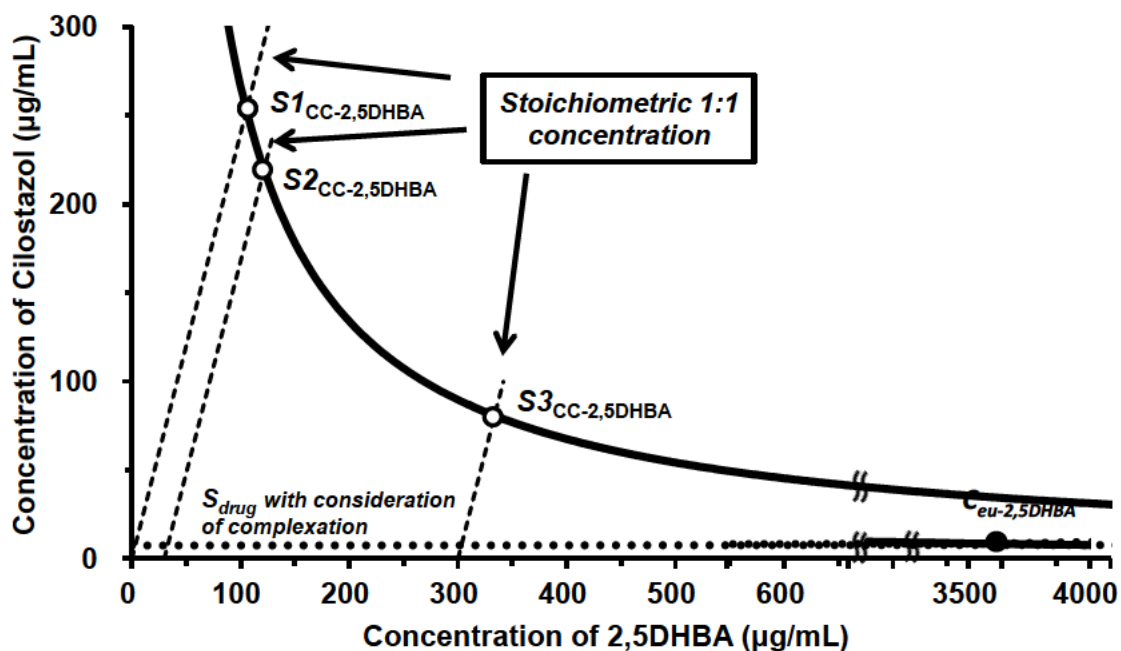


Figure 4-7-2. The phase solubility diagram of CLZ-2,5DHBA cocrystal. Open circles represent the solubility of the cocrystal in SGF, $S1_{CC-2,5DHBA}$, the solubility of the cocrystal in SGF containing 30 $\mu\text{g/mL}$ of 2,5DHBA, $S2_{CC-2,5DHBA}$, and the solubility of the cocrystal in SGF containing 300 $\mu\text{g/mL}$ of 2,5DHBA, $S3_{CC-2,5DHBA}$, respectively. Closed circle represents the eutectic point, $C_{eu-2,5DHBA}$.

以上の結果より、共通イオンの付加は Cocrystal の過飽和に対して一定の効果があることが確認され、見かけの溶解度が制御されることにより持続的過飽和が効果的に示されることが確認された。一方で、共通イオン効果は初期の過飽和濃度の最大値を引き上げる効果には乏しく、特に表面媒介転移による再結晶化を伴う Cocrystal では、初期の溶出上昇に制限がかかるため、過飽和濃度プロファイルへの効果はやや限定的となることが示唆された。

また、共通イオンの適切な付加量は Cocrystal の Eutectic point とも関係する。Figure 4-7-1 及び Figure 4-7-2 にはそれぞれの CLZ cocrystal における Eutectic point, C_{eu} を示したが、CLZ-4HBA cocrystal では 4HBA 濃度が約 247 $\mu\text{g/mL}$ 付近に Eutectic point があるのに対して、CLZ-2,5DHBA cocrystal では 2,5DHBA 濃度が約 3600 $\mu\text{g/mL}$ 付近と顕著に高い Eutectic point を示している。この Eutectic point よりも Coformer 濃度が高まると、Cocrystal は安定的に維持されるようになり、溶解進行が鈍化するため過飽和を示さなくなることが想定される。ただし、*in vivo* では経口投与された Cocrystal 及び Coformer は吸収や希釈を伴って濃度低下していくため、Eutectic point よりも高い状態で維持されることは考えにくく、むしろ投与初期に共通イオン効果で Cocrystal を安定に維持させることで急激な再結晶化リスクを低減し、吸収と希釈に伴って徐々に発現する過飽和が、BA の最大化に効果的である可能性も大いに有り得ると考えられる。

第3項 CLZ cocrystal の Eutectic point と過飽和及び経口吸収性

第3章にて、溶出試験における過飽和と BA との間には良好な相関関係があることを報告した。しかし、BA が過飽和の序列と必ずしも一致しないケースもいくつか存在する。その一例として、微粉砕した CLZ-4HBA cocrystal-JM と CLZ-2,4DHBA cocrystal との関係性が挙げられる。Figure 4-8 には両者の溶出プロファイルの比較、Figure 4-9 には血中濃度プロファイルの比較、及び Table 4-2 には PK パラメータの比較を示す。これらのデータは前項までに報告したデータを比較のために再度引用した。Figure 4-8 で見られるように、CLZ 濃度が 500 µg/mL 条件ではほぼ類似の過飽和を示しており、100 µg/mL 濃度条件では CLZ-2,4DHBA cocrystal で過飽和がより持続する結果が示されている。にもかかわらず Figure 4-9 及び Table 4-2 では CLZ-4HBA cocrystal-JM で顕著に高い C_{max} 及び AUC_{0-8h} を示しており、*in vivo* と *in vitro* との間に差異が認められている。

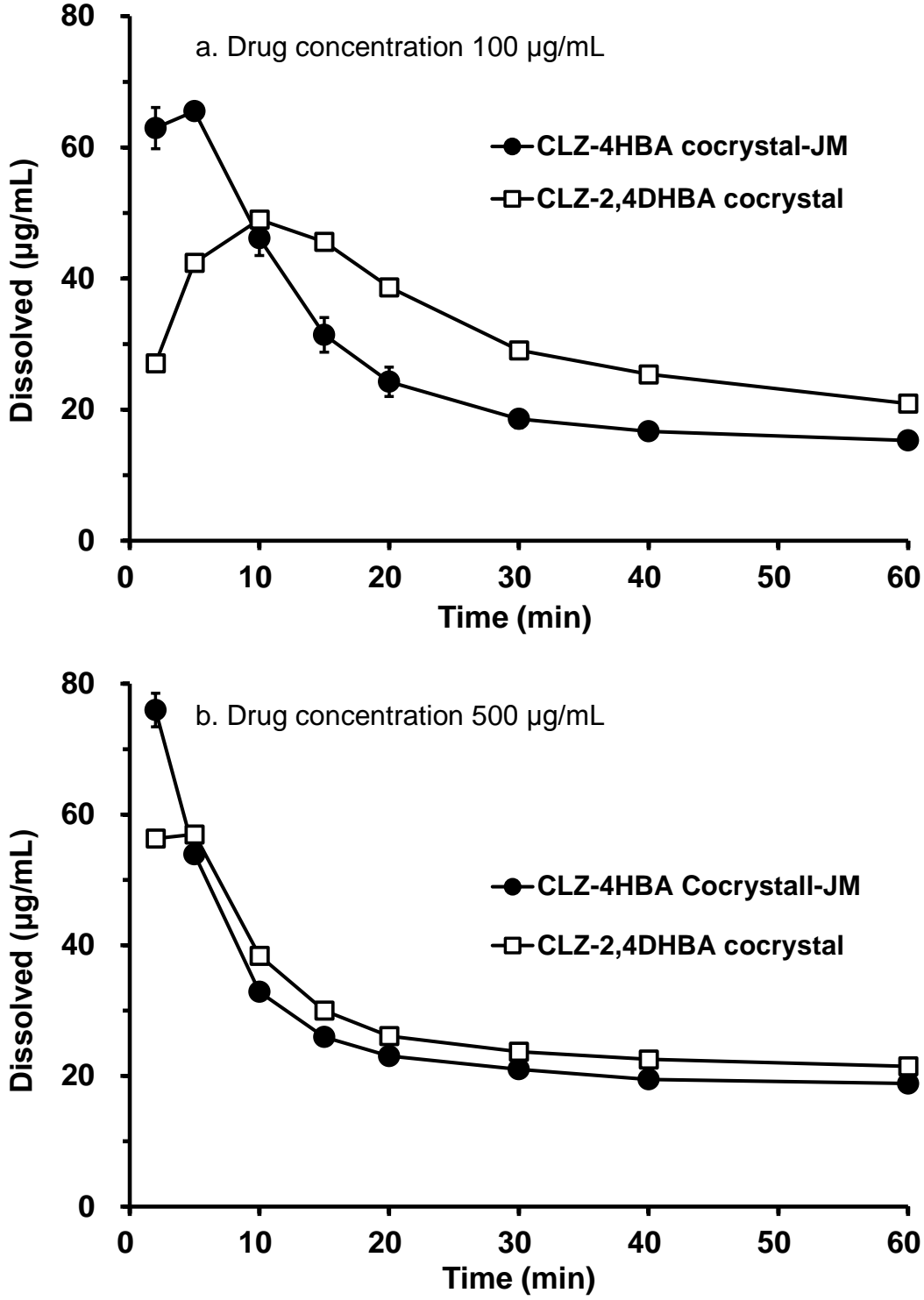


Figure 4-8. The dissolution profiles of CLZ cocrystals in SGF containing 1% Hypromellose at 37 °C. The drug concentrations applied into the dissolution media are (a) 100 µg/mL and (b) 500 µg/mL. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=3). The dissolution profiles are cited from Figure 3-7-2, and Figure 4-4.

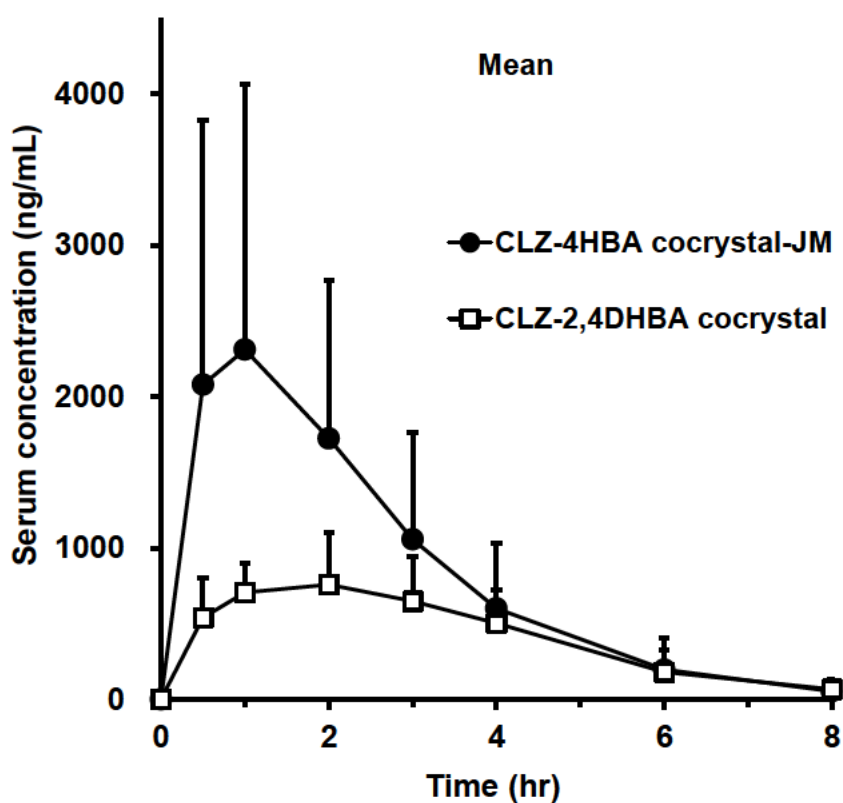


Figure 4-9. Mean serum concentration - time profiles of CLZ-4HBA cocrystal-JM and CLZ-2,4DHBA cocrystal after an oral administration at a dose of 100 mg/body into fasted beagle dogs. The results are expressed as the mean with the bar as the S.D. (n=4). The profiles are cited from Figure 3-9, and Figure 4-5.

Table 4-2. Pharmacokinetic parameters.

Substance	CLZ-4HBA cocrystal-JM	CLZ-2,4DHBA cocrystal
C_{max}	2412±1631	869±306
AUC_{0-8h} (ng/mL·hr)	6899±5002	3384±1034
t_{max} (hr)	1.3±0.5	2.0±0.8
MRT_{0-8h} (hr)	2.2±0.2	2.9±0.7

Results are expressed as the mean±S.D. (n=4).

The values are cited from Table 3-5 and Table 4-1.

本章の第2項でも示したが、この結果は Cocrystal の Eutectic point 及び Eutectic constant によって説明することができる。Eutectic point は第3章の Figure 3-6 に示す溶解度曲線と、以下の式で表わされる溶液中での Coformer との複合体形成に伴う可溶化を考慮した CLZ 溶解度直線との交点で導き出せる⁵⁸⁾。

$$[CLZ]_T = [CLZ]_0 + \frac{K_{11}[CLZ]_0[Coformer]_T}{1 + K_{11}[CLZ]_0} \quad (\text{Equation 3})$$

ここで、 $[CLZ]_0$ は Coformer の非存在下での CLZ の溶解度 (S_{drug}) を示す。更に Eutectic point での基剤濃度、 $[CLZ]_{eu}$ 、 $[Coformer]_{eu}$ から以下の式によって Eutectic constant を算出できる^{69,70)}。

$$K_{eu} = \frac{[Coformer]_{eu}}{[CLZ]_{eu}} \quad (\text{Equation 4})$$

CLZ cocrystal の理論溶解度曲線と Equation 3、及び Equation 4 を用いて算出された CLZ cocrystal の Eutectic point と Eutectic constant を Table 4-3 に示す。 $[CLZ]_{eu}$ は大きく変わらないが、 $[Coformer]_{eu}$ はそれぞれの組み合わせで異なった値を示しており、CLZ-4HBA cocrystal では 246.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CLZ-2,4DHBA cocrystal では 644.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CLZ-2,5DHBA cocrystal においては 3599.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と非常に高い値を示した。この Eutectic point 濃度以上であれば Cocrystal は安定に維持できると考えられるため、CLZ の臨床用量である 100 mg 相当の Cocrystal に対して、再結晶化を生じない最大液量が導き出せる。この Cocrystal を安定に維持できる最大液量は、CLZ-4HBA cocrystal では約 152 mL、CLZ-2,4DHBA cocrystal では約 65 mL、CLZ-2,5DHBA cocrystal では約 12 mL とそれぞれ算出でき、CLZ-2,5DHBA cocrystal はイヌでの投薬条件である 100 mg / 40 mL の懸濁状態でも再結晶化が進行するリスクがあることを示している。CLZ-2,4DHBA cocrystal でも近い状態であり、経口投与後の胃内希釈に伴って速やかに再結晶化が進行する可能性が示唆される。一方で、CLZ-4HBA cocrystal では投薬時の液容量と最大液量との間に余裕があり、胃内希釈が進行しても一定程度は Cocrystal が安定的に維持されることが推察される。*in vitro* 溶出試験ではこのような消化管内での希釈や吸収の影響を加味しておらず、この機構が *in vivo* との相違を示した要因と言える。第3章で示した CLZ-4HBA cocrystal の非晶質固体分散体を超える経口吸収性はこのような特徴的な溶解特性を効

果的に利用した結果とも考えられ、特に再結晶化が著しく進行する化合物においては Eutectic point または Eutectic constant の低い Cocrystal を選択する、または Eutectic constant を低く制御する製剤設計⁶⁹⁾によって高いパフォーマンスが得られる可能性も示唆される。

Table 4-3. The eutectic points and the eutectic constants of CLZ cocrystals.

Substance	CLZ-4HBA cocrystal	CLZ-2,4DHBA cocrystal	CLZ-2,5DHBA cocrystal
Eutectic point of CLZ, [CLZ] _{eu} (μg/mL)	7.8	7.8	8.4
Eutectic point of Coformer, [Coformer] _{eu} (μg/mL)	246.7	644.6	3599.4
Eutectic constant, K_{eu}	85.1	197.4	1024.9

第4節 小括

CLZ-4HBA cocrystal は過飽和持続が比較的良好な Cocrystal であり、溶液媒介転移に伴う再結晶化の進行によって過飽和濃度は緩やかに低下する。対して、CLZ-2,5DHBA cocrystal は溶出試験初期における一時的な溶出上昇が認められず、再結晶化機構として表面媒介転移が疑われる。この溶解特性の異なる Cocrystal に対して、微粉碎化や共通イオン効果の利用による過飽和制御を試みた。

CLZ-4HBA cocrystal では微粉碎化に伴い溶出初期における過飽和濃度の上昇と速やかな再結晶化が認められた。イヌを用いた経口吸収試験では、微粉碎化によって有意な差は認められなかったが、平均値ベースでは C_{max} 比で 1.2 倍の若干の上昇、 AUC_{0-8h} 比では 0.9 倍と若干の低下が認められた。CLZ-2,5DHBA cocrystal では微粉碎化に伴い表面媒介転移による再結晶速度を上回る形で一時的な過飽和が検出された。イヌを用いた経口吸収試験では、CLZ-4HBA cocrystal と同様に有意な差は認められなかったが、平均値ベースでは溶出試験結果を反映するように、 C_{max} 比で 2.4 倍、 AUC_{0-8h} 比で 1.2 倍の上昇が認められた。CLZ-2,5DHBA cocrystal では微粉碎によって若干の BA 上昇が確認されたが、その効果は限定的であり、表面媒介転移を克服するためには更に溶解速度を加速させる必要性が示唆された。

Cocrystal の共通イオン効果を利用した過飽和制御を試みたところ、CLZ-4HBA cocrystal では 4HBA の付加に伴って見かけの溶解度が低下し、初期溶出の低下と持続的な過飽和が検出された。CLZ-2,5DHBA cocrystal でも同様に、2,5DHBA の付加に伴って見かけの溶解度が低下し、30 $\mu\text{g/mL}$ 程度の低濃度の付加ではほとんど影響がなかったものの、300 $\mu\text{g/mL}$ の高濃度条件 (Eutectic point 以下) では持続的な過飽和に対する一定の効果が確認された。ただし、Cocrystal の共通イオンの追加配合は過飽和持続に一定の効果があるものの、過飽和濃度の最大値を引き上げる効果には乏しく、特に表面媒介転移による再結晶化を伴う Cocrystal では、初期の溶出上昇に制限がかかるため、過飽和濃度プロファイルへの効果はやや限定的となることが示唆された。

CLZ-4HBA cocrystal は持続的な過飽和を示すと共に、比較的低い Eutectic point が特徴として挙げられる。CLZ-4HBA cocrystal の高いパフォーマンスは、Eutectic point が低いことで消化管内にて Cocrystal が比較的稳定に維持されやすく、それが高い BA を示した要因とも考えられた。

共通イオン効果や Eutectic point は, Cocrystal の過飽和特性や BA 改善に大きく影響することが検証されると共に, その制御はパフォーマンスの最大化に効果的な手法となる可能性も秘めていると考えられた。

第5章 総括

本報にて, CLZは3HBA, 4HBA, 2,4DHBA, 及び2,5DHBA と化学量論比 1:1 の Cocrystal を新規に形成し, ヒドロキシ安息香酸のパラ位またはメタ位の水酸基が Cocrystal の結晶パッキングに重要であることが示唆された。

CLZ-4HBA cocrystal, CLZ-2,4DHBA cocrystal, 及び CLZ-2,5DHBA cocrystal は溶解度積から算出される平衡溶解度より, CLZ 結晶と比較してそれぞれ 9.5 倍, 14.5 倍, 及び 34.3 倍高い溶解度を示した。1% Hypromellose を含む SGF での溶出試験より, 平衡溶解度と過飽和の持続とは逆の関係性があり, マイルドな溶解度上昇を示した CLZ-4HBA cocrystal で最も持続的な過飽和を示した。イヌを用いた経口吸収試験における BA は溶出試験における過飽和挙動と良好な相関性を示し, ハンマーミル処理した CLZ に対して, CLZ-4HBA cocrystal で 7.1 倍, CLZ-2,4DHBA cocrystal で 3.1 倍, CLZ-2,5DHBA cocrystal で 1.8 倍高い BA を示した。中でも, CLZ-4HBA cocrystal は非晶質固体分散体と比較しても有意に高い BA を示し, これまで検証されることのなかった Cocrystal の溶解度と過飽和との逆の関係性を明らかにすると同時に, 過飽和と経口吸収性との正の関係性を検証した上で, 薬物物性に適した溶解度を有する Cocrystal 設計が非晶質固体分散体をも凌ぐ BA を示す余地があることが本報で新たに示された。

CLZ のように再結晶化の速やかな難水溶性化合物では, Cocrystal 化による溶解度の最大化が必ずしも高いパフォーマンスを示す訳ではなく, むしろ過剰に上昇する過飽和度によって吸収改善効果に制限がかかる可能性が示唆される。Figure 5-1 には Cocrystal または非晶質固体分散体における溶出・再結晶化のイメージを示す。CLZ-4HBA cocrystal, CLZ-2,4DHBA cocrystal, 及び非晶質固体分散体 (CLZ-ASD) は平衡溶解度 (C_{eq}) に依存した溶出速度によって過飽和が進む。過飽和状態では一定速度で膜透過を伴いながら溶出速度に応じて過飽和度は変動する。同時に, 過剰な過飽和度の上昇は安定晶核の生成を促し, 再結晶化のスキームへとシフトする。核生成された安定晶は, その平衡溶解度と周囲環境の CLZ 濃度との濃度差に伴って結晶成長が進行し, 過飽和は徐々に失われていく。BA を最大化するためには, 過飽和状態を如何に維持するかが重要であり, 故に核生成に関与する原体の平衡溶解度と溶出速度は再結晶化の進行に大きく関わっていることが示唆される。また, 結晶成長過程におけるファクターには安定晶の溶解度も含まれており, この安定晶の溶解度が著しく低い場合には, 周囲環境との濃度差の制

御（周囲環境の薬物濃度の制御）も過飽和維持に重要となると考えられる。本報では、このような溶解・再結晶化の機構が Cocrystal のような準安定晶でも認められることを実験的に検証し、Cocrystal のパフォーマンス最大化に重要な因子となることが示された。

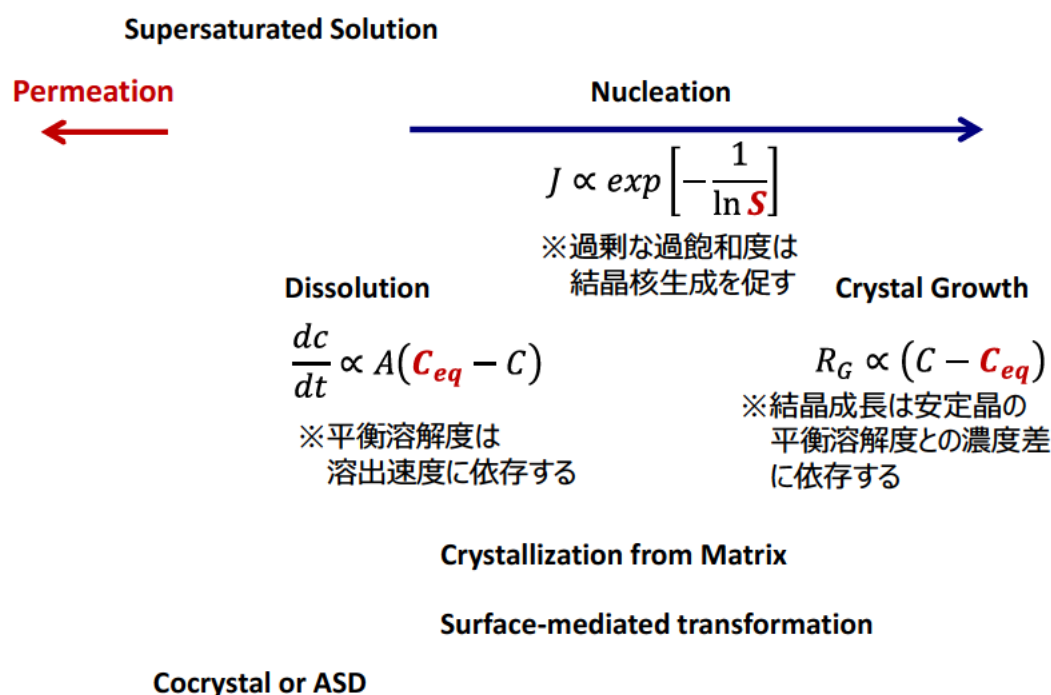


Figure 5-1. Schematic illustrating the competition between dissolution and crystallization via the solid or solution state for cocrystal or amorphous systems.⁶⁵⁾

また Figure 5-1 には、こうした機構とは別に準安定晶から安定晶への直接変換も存在することを示唆している。非晶質固体分散体（ASD）ではマトリクス中での再結晶化の例が挙げられているが、CLZ-2,5DHBA cocrystal の表面媒介転移（Surface-mediated transformation）もこのスキームに乗っていると推察される。この場合、再結晶化は固相表面近傍で急速に進行するため、Cocrystal の比表面積を増大させて速やかな溶解を促す必要がある。実際に本報ではジェットミルによる微粉碎検討を報告し、過飽和に対して一定の効果が認められた。ただし、その平均粒子径は 3~5 μm 程度であり、表面媒介転移を克服するには乏しいことが *in vivo* 結果から考察された。また、BA を最大化させるためには、溶解速度のコントロール以外に安定晶への再結晶化や沈殿・凝集を防ぐような製剤設計も非常に重要である⁷³⁻⁷⁵⁾。このような、表面媒介転移の克服と再結晶化の抑

制を考慮すると、Nano-Cocrystal Solid Dispersion^{76,77)}のような製剤システムが、特に表面媒介転移を示すようなケースでは、高いBAが期待できるかもしれない。

更に、Cocrystalの過飽和制御には共通イオンの付加やEutectic pointまたはEutectic constantの制御も効果的であることが示された。特にCLZ-4HBA cocrystalは、共通イオン効果によって更に持続的な過飽和が期待できると共に、比較的低いEutectic pointが消化管内でのCocrystalの安定化と効率的な過飽和発現を促し、結果として有意に高いBAが示されたものと推察された。表面媒介転移が疑われるCLZ-2,5DHBA cocrystalでも、共通イオンの付加によって過飽和持続に一定の効果があるものの、過飽和濃度の最大値を引き上げる効果には乏しく、特に表面媒介転移による再結晶化は初期の溶出上昇に制限がかかるため、過飽和持続効果はやや限定的となることが示唆された。ただし、少なくとも溶液媒介転移型の過飽和プロファイルには共通イオンは非常に効果的であり、それぞれのCocrystalの溶解特性に応じた適切な溶解制御と原体設計がパフォーマンス最大化に重要となるものと示唆された。

以上の結果より、本研究はこれまで検証されてこなかったCocrystalの溶解特性と過飽和、及び経口吸収性との関係性を明らかとすると同時に、経口吸収性の改善のための手法としてCocrystalの高い有用性が示された。また、単純な溶解度上昇を狙う探索的スクリーニングに警鐘を鳴らす一方で、過飽和持続のための溶解制御や原体・製剤設計を組み合わせることで、Cocrystalの有用性はより一層高められる可能性を秘めていることが新たに検証された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科・尾関哲也教授、ならびに明治薬科大学・深水啓朗教授に衷心より感謝の意を表します。

本研究の機会を与えられ、特段の御便宜を賜りました、大塚製薬株式会社製剤研究所・西林徹顧問、加藤雄介所長、戸田正文室長に厚く御礼申し上げます。

本研究に直接御指導、御助言賜りました、大塚製薬株式会社製剤研究所・三宅正晃博士、鎌田直興博士、山崎浩之博士、宮田憲一博士、中村和也修士、ならびに大塚製薬株式会社創薬化学研究所・川戸達矢博士、板東政彦修士、中石雄一郎博士に心より御礼申し上げます。

本研究に関して、ご査読ならびにご討論して頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科・湯浅博昭教授、松永民秀教授、ならびに名古屋工業大学・出羽毅久教授に深く感謝致します。

最後に、本研究遂行にあたり、健康の気遣いと研究を継続できる環境を与えてくれた妻 絵美と息子 侑晟に心より感謝致します。

引用文献

- 1) Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. Theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: correlation on *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 413-420.
- 2) Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressman, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 265-278.
- 3) Thayer, A. M. Finding solutions. *Chem. Eng. News* **2010**, *88*, 13-18.
- 4) Babu, N. J.; Nangia, A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 2662-2679.
- 5) Kang, B. K.; Lee, J. S.; Chon, S. K.; Jeong, S. Y.; Yuk, S. H.; Khang, G.; Lee, H. B.; Cho, S. H. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int. J. Pharm.* **2004**, *274*, 65-73.
- 6) Dahan, A.; Hoffman, A. The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: the ability of *in vitro* lipolysis and consecutive *ex vivo* intestinal permeability data to predict *in vivo* bioavailability in rats. *Eur. J. Pharm. Bio.* **2007**, *67*, 96-105.
- 7) Yin, Y.; Cui, F.; Mu, C.; Choi, M.; Kim, J. S.; Chung, S.; Shim, C.; Kim, D. Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J. Control. Release* **2009**, *140*, 86-94.
- 8) Gould, P. L. Salt selection for basic drugs. *Int. J. Pharm.* **1986**, *33*, 201-217.
- 9) Guzman, H. R.; Tawa, M.; Zhang, Z.; Ratanabanangkoon, P.; Shaw, P.; Gardner, C. R.; Chen, H.; Moreau, J. P.; Almarsson, O.; Remenar, J. F. Combined use of crystalline salt forms and precipitation inhibitors to improve oral absorption of celecoxib from solid oral formulation. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2686-2702.
- 10) Hisada, N.; Takano, R.; Takata, N.; Shiraki, K.; Ueto, T.; Tanida, S.; Kataoka, M.; Yamashita, S. Characterizing the dissolution profiles of supersaturable salts, cocrystals, and solvates to enhance *in vivo* oral absorption. *Eur. J. Pharm. Bio.* **2016**, *103*, 192-199.
- 11) Lohani, S.; Cooper, H.; Jin, X.; Nissley, B. P.; Manser, K.; Rakes, L. H.; Cummings, J. J.; Fauty, S. E.; Bak, A. Physicochemical properties, form, and formulation selection strategy for a biopharmaceutical classification system class II preclinical drug candidate. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 3007-3021.
- 12) Kim, J-S.; Kim, M-S.; Park, H. J.; Jin, S-J.; Lee, S. Hwang, S-J. Physicochemical

- properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemicalcium using spray-drying and SAS process. *Int. J. Pharm.* **2008**, *359* (1-2), 211-219.
- 13) Serajuddin, A. T. M.; Solid dispersions of poorly water-doluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1058-1066.
 - 14) Thakuria, R.; Delori, A.; Jones, W.; Lipert, M. P.; Roy, L.; Rodriguez-Hornedo, N. Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 101-125.
 - 15) Hancock, B. C.; Zografi, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86* (1), 1-12.
 - 16) McNamara, D. P.; Childs, S. L.; Giordano, J.; Iarriccio, A.; Cassidy, J.; Shet, M. S.; Mannion, R.; O'Donnell, E.; Park, A. Use of glutaric acid cocrystal to improve oral bioavailability of a low solubility API. *Pharm. Res.* **2006**, *23* (8), 1888-1896.
 - 17) Huang, Y.; Zhang, B.; Gao, Y. Zhang, J. Shi, L. Baicalein-Nicotinamide cocrystal with enhanced solubility, dissolution, and oral bioavailability. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 2330-2337.
 - 18) Smith, A. J.; Kavuru, P.; Wojtas, L.; Zaworotko, M. J.; Shytle, R. D. Cocrystals of quercetin with improved solubility and oral bioavailability. *Mol. Pharm.* **2011**, *8* (5), 1867–1876.
 - 19) Chen, Y.; Li, L.; Yao, J.; Ma, Y.-Y.; Chen, J.-M.; Ju, T.-B. Improving the solubility and bioavailability of apixaban via apixaban-oxalic acid cocrystal. *Clyst. Growth Des.* **2016**, *16*, 2923-2930.
 - 20) Takata, N. Cocrystal screening and its application in improvement of physicochemical properties of APIs. *Pharm. Tech. Japan* **2009**, *25* (12), 2543-2554.
 - 21) Shan, N; Zawarotko, M. J. The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 440-446.
 - 22) Kimura, Y.; Tani, T.; Kanbe, T.; Watanabe, K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* **1985**, *35*, 1144-1149.
 - 23) Jinno, J.; Kamada, N.; Miyake, M.; Yamada, K.; Mukai, T.; Odomi, M.; Toguchi, H.; Liversidge, G. G.; Kazutaka, H.; Kimura, T. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 56-64.
 - 24) Bramer, S. L.; Forbes, W. P. Relative bioavailability and effects of a high fat meal on single dose cilostazol pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **1999**, *37* (suppl. 2), 13–23.
 - 25) Childs, S. L.; Hardcastle, K. I. Cocrystals of piroxicam with carboxylic acids. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7* (7), 1291-1304.

- 26) Childs, S. L.; Rodrigues-Hornedo, N.; Reddy, L. S.; Jayasanker, A.; Maheshwari, C.; McCausland, L.; Shipplett, R.; Stahly, B. C. Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine. *Cryst. Eng. Comm.* **2008**, *10*, 856-864.
- 27) Takata, N.; Shiraki, K.; Takano, R.; Hayashi, Y.; Terada, K. Cocrystal screening of stanolone and mestanolone using slurry crystallization. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 3032-3037.
- 28) Trask, A. V.; Samuel Motherwell, W. D.; Jones, W. Pharmaceutical cocrystallization: engineering a remedy for caffeine hydration. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 1013-1021.
- 29) Trask, A. V.; Streek, J.; Samuel Motherwell, W. D.; Jones, W. Achieving polymorphic and stoichiometric diversity in cocrystal formation: Importance of solid-state grinding, powder X-ray structure determination, and seeding. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5* (6), 2233-2241.
- 30) Frišćić, T.; Jones, W. Recent advances in understanding the mechanism of cocrystal formation via grinding. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 1621-1637.
- 31) Berry, D. J.; Seaton, C. C.; Clegg, W.; Harrington, R. W.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Storey, R.; Jones, W.; Frii, T.; Blagden, N. Applying hot-stage microscopy to co-crystal screening: A study of Nicotinamide with seven active pharmaceutical ingredients. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1697-1712.
- 32) Shan, N.; Toda, F.; Jones, W. Mechanochemistry and co-crystal formation: Effect of solvent on reaction kinetics. *Chem. Commun.* **2002**, 2372-2373.
- 33) Weyna, D. R.; Shattock, T.; Vishweshwar, P.; Zawarotko, M. J. Synthesis and structural characterization of cocrystals and pharmaceutical cocrystals: Mechanochemistry vs slow evaporation from solution. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (2), 1106-1123.
- 34) 大塚製薬（株）社内データ.
- 35) Bučar, D.-K.; Henry, R. F.; Lou, X.; Duerst, R. W.; MacGillivray, L. R.; Zhang, G. G. Z. Cocrystals of caffeine and hydroxybenzoic acids composed of multiple supramolecular heterosynthons: Screening via solution-mediated phase transformation and structural characterization. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 1932-1943.
- 36) 小林啓二, 林直人 固体有機化学, 化学同人: 京都, **2009**.
- 37) Sheldrick, G. M. SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr., Sect. A.* **2015**, *71*, 3–8.
- 38) Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr., Sect. C.* **2015**, *71*, 3–8.
- 39) Good, D. J.; Rodriguez-Hornedo, N. Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals.

- Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (5), 2252-2264.
- 40) Descamps, M.; Willart, J. F.; Dudognon, E.; Caron, V. Transformation of pharmaceutical compounds upon milling and comilling: The role of T_g . *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96* (5), 1398-1407.
 - 41) Willart, J. F.; Descamps, M. Solid state amorphization of pharmaceuticals. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (6), 905-920.
 - 42) Seefeldt, K.; Miller, J.; Alvarez-Nunez, F.; Rodriguez-Hornedo, N. Crystallization pathways and kinetics of carbamazepine-nicotinamide cocrystals from the amorphous state by *In Situ* thermomicroscopy, spectroscopy and calorimetry studies. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96* (5), 1147-1158.
 - 43) Chavan, R. B.; Thipparaboina, R.; Kumar, D.; Shastri, N. R. Co amorphous systems: A product development perspective. *Int. J. Pharm.* **2016**, *515*, 403-415.
 - 44) Grohgan, H.; Löbmann, K.; Priemel, P.; Jensen, K. T.; Graeser, K.; Strachan, C.; Rades, T. Amorphous drugs and dosage forms. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2013**, *23* (4), 403-408.
 - 45) Database of Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Reviews, <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm084104.htm>.
 - 46) Yamashita, H.; Hirakura, Y.; Yuda, M.; Terada, K. Coformer screening using thermal analysis based on binary phase diagrams. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (8), 1946-1957.
 - 47) Vishweshwar, P.; McMahon, J. A.; Peterson, M. L.; Hickey, M. B.; Shattock, T. R.; Zaworotko, M. J. Crystal engineering of pharmaceutical co-crystals from polymorphic active pharmaceutical ingredients. *Chem. Commun.* **2005**, *36*, 4601-4603.
 - 48) Wouters J. Pharmaceutical salts and co-crystals. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; **2012**.
 - 49) Stahl PH, Wermuth, Camille G. Handbook of pharmaceutical salts. 2nd ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, **2011**.
 - 50) Almarsson, Ö; Zaworotko, M. J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? *Chem. Commun.* **2004**, *17*, 1889-1896.
 - 51) Tomaszewska, I.; Karki, S.; Shur, J.; Price, R.; Fotaki, N. Pharmaceutical characterization and evaluation of cocrystals: Importance of *in vitro* dissolution conditions and type of conformer. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 380-388.
 - 52) Sanphui, P.; Kusum, V.; Clara, D.; Malviya, N.; Ganguly, S.; Desiraju, G. R. Cocrystals of Hydrochlorothiazide: Solubility and Diffusion/Permeability enhancements through drug-coformer interactions. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1615-1622.

- 53) Ferretti, V.; Dalpiaz, A.; Bertolasi, V.; Ferraro, L.; Beggiato, S.; Spizzo, F.; Spisni, E.; Pavan, B. Indomethacin co-crystals and their parent mixtures: Does the intestinal barrier recognize them differently. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1501-1511.
- 54) Dymicky, M.; Huhtanen, C. N. Antimicrob. Inhibition of *Clostridium botulinum* by *p*-Hydroxybenzoic Acid *n*-Alkyl Esters. *Agents Chemother.* **1979**, *15* (6), 798–801.
- 55) Herzog, K. A.; Swarbrick, J. Drug permeation through thin-model membranes III: Correlations between *In vitro* transfer, *In vivo* absorption, and physicochemical parameters of substituted benzoic acids. *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60* (11), 1666–1668.
- 56) Kortüm, G.; Vogel, W.; Andrussow, K. Dissociation constants of organic acids in aqueous solution. *Pure Appl. Chem.* **1960**, *1* (2-3), 187-536.
- 57) Heinrich, S. P.; Wermuth, C. G. Handbook of pharmaceutical salts properties, selection, and use; Verlag Helvetica Chimica Acta: Switzerland, **2008**, 339.
- 58) Nerm, S.; Rodriguez-Spong, B.; Rodriguez-Hornedo, N. Phase solubility diagrams of cocrystals are explained by solubility product and solution complexation. *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 592-600.
- 59) Bethune, S. J.; Hung, N.; Jayasankar, A.; Rodriguez-Hornedo, N. Understanding and predicting the effect of cocrystal components and pH on cocrystal solubility. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 3976-3988.
- 60) Bramer, S. L.; Forbes, W. P.; Mallikaarjun, S. Cilostazol pharmacokinetics after single and multiple oral doses in healthy males and patients with intermittent claudication resulting from peripheral arterial disease. *Clin Pharmacokinet.* **1999**, *37* (Suppl 2), 1-11.
- 61) Sagawa, K.; Li, F.; Liese, R.; Sutton, S. C. Fed and fasted gastric pH and gastric residence time in conscious beagle dogs. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98* (7), 2494-2500.
- 62) Abuhelwa, A. Y.; Foster, D. J. R.; Upton, R. N. A quantitative review and meta-models of the variability and factors affecting oral drug absorption Part II: Gastrointestinal transit time. *AAPS Journal* **2016**, *18* (5), 1322-1333.
- 63) 大塚製薬（株）社内データ.
- 64) Sato, T.; Okada, A.; Sekiguchi, K.; Tsuda, Y.; Difference in physic-pharmaceutical properties between crystalline and noncrystalline 9,3''-diacetylmidecamycin. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 2675-2682.
- 65) Alonzo, D. E.; Zhang, G. G. Z.; Zhou, D.; Gao, Y.; Taylor, L. S. Understanding the behavior of amorphous pharmaceutical systems during dissolution. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (4), 608-618.
- 66) Greco, K.; Bogner, R. Solution-mediated phase transformation: Significance during

- dissolution and implications for bioavailability. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (9), 2996-3018.
- 67) Hawley, M.; Morozowich, W. Modifying the diffusion layer of soluble salts of poorly soluble basic drugs to improve dissolution performance. *Mol. Pharm.* **2010**, *7* (5), 1441-1449.
- 68) Noyes, A.; Whitney, W. The rate of solution of solid substances in their own solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1897**, *19*, 930-940.
- 69) Alhalaweh, A.; Ali, H. R. H.; Velaga, S. P. Effects of polymer and surfactant on the dissolution and transformation profiles of cocrystals in aqueous media. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 643-648.
- 70) Good, D. J.; Rodriguez-Hornedo, N. Cocrystal eutectic constants and prediction of solubility behavior. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 1028-1032.
- 71) Yamashita, H.; Sun, C. C. Harvesting potential dissolution advantages of soluble cocrystals by depressing precipitation using the common coformer effect. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16*, 6719-6721.
- 72) Shiraki, K.; Takata, N.; Takano, R.; Hayashi, Y.; Terada, K. Dissolution improvement and the mechanism of the improvement from cocrystallization of poorly water-soluble compounds. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (11), 2581-2592.
- 73) Childs, S. L.; Kandi, P.; Lingireddy, S. R. Formulation of a danazol cocrystal with controlled supersaturation plays an essential role in improving bioavailability. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 3112-3127.
- 74) Li, S.; Pollock-Dove, C.; Dong, L. C.; Chen, J.; Creasey, A. A.; Dai, W. Enhanced bioavailability of a poorly water-soluble weakly basic compound using a combination approach of solubilization agents and precipitation inhibitors: A case study. *Mol. Pharmaceutics.* **2012**, *9*, 1100-1108
- 75) Xu, S.; Dai, W.-G. Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (1), 36-43
- 76) Ozeki, T.; Beppu, S.; Mizoe, T.; Takashima, Y.; Yuasa, H.; Okada, H. Preparation of polymeric submicron particle-containing microparticles using a 4-fluid nozzle spray drier. *Pharm. Res.* **2006**, *23* (1), 177-183.
- 77) Mizoe, T.; Ozeki, T.; Okada, H. Preparation of drug nanoparticle-containing microparticles using a 4-fluid nozzle spray drier for oral, pulmonary, and injection dosage forms. *J. Control. Release* **2007**, *122*, 10-15.

参考情報 (単結晶構造解析による CLZ cocrystal の結晶パッキング)

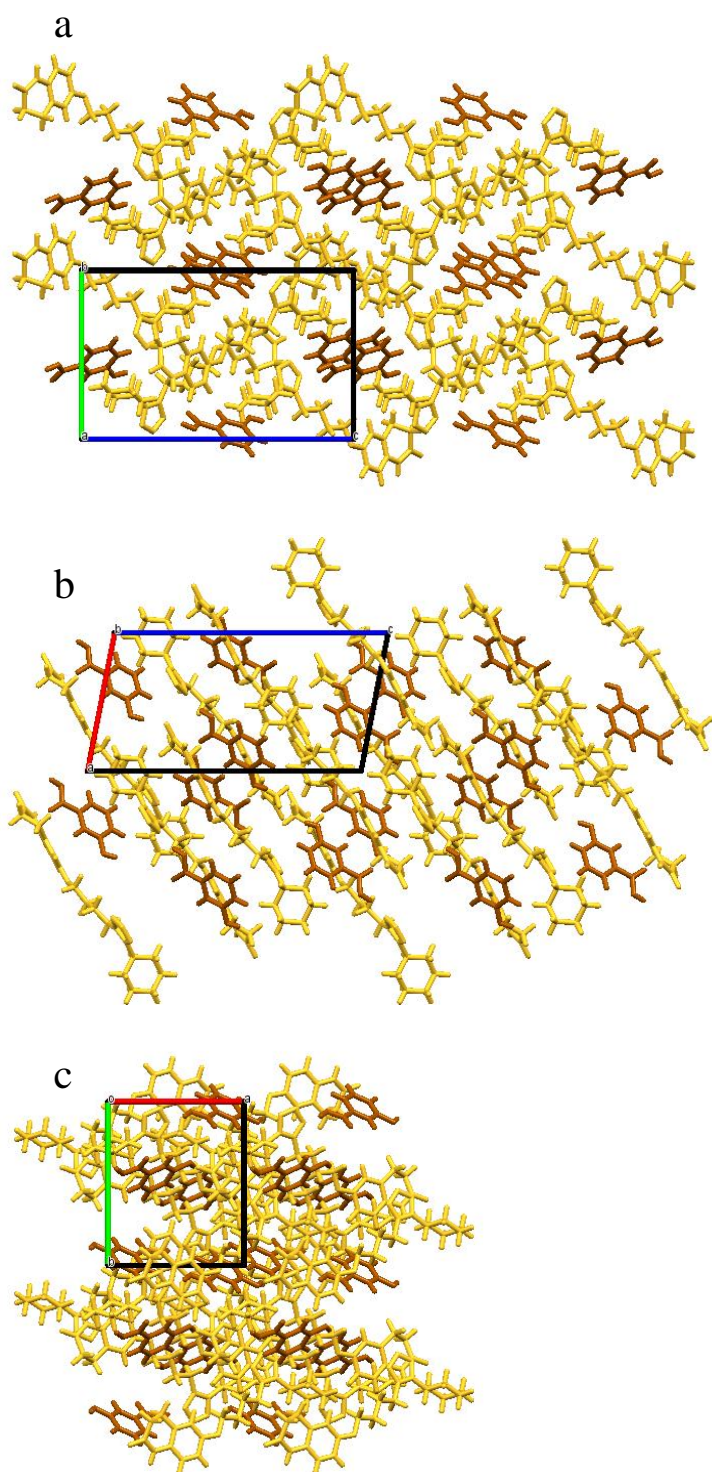


Figure S1. Crystal packing of CLZ-3HBA cocrystal, showing stacks of dimeric units (a) along the *a* axis, (b) along the *b* axis, and (c) along the *c* axis.

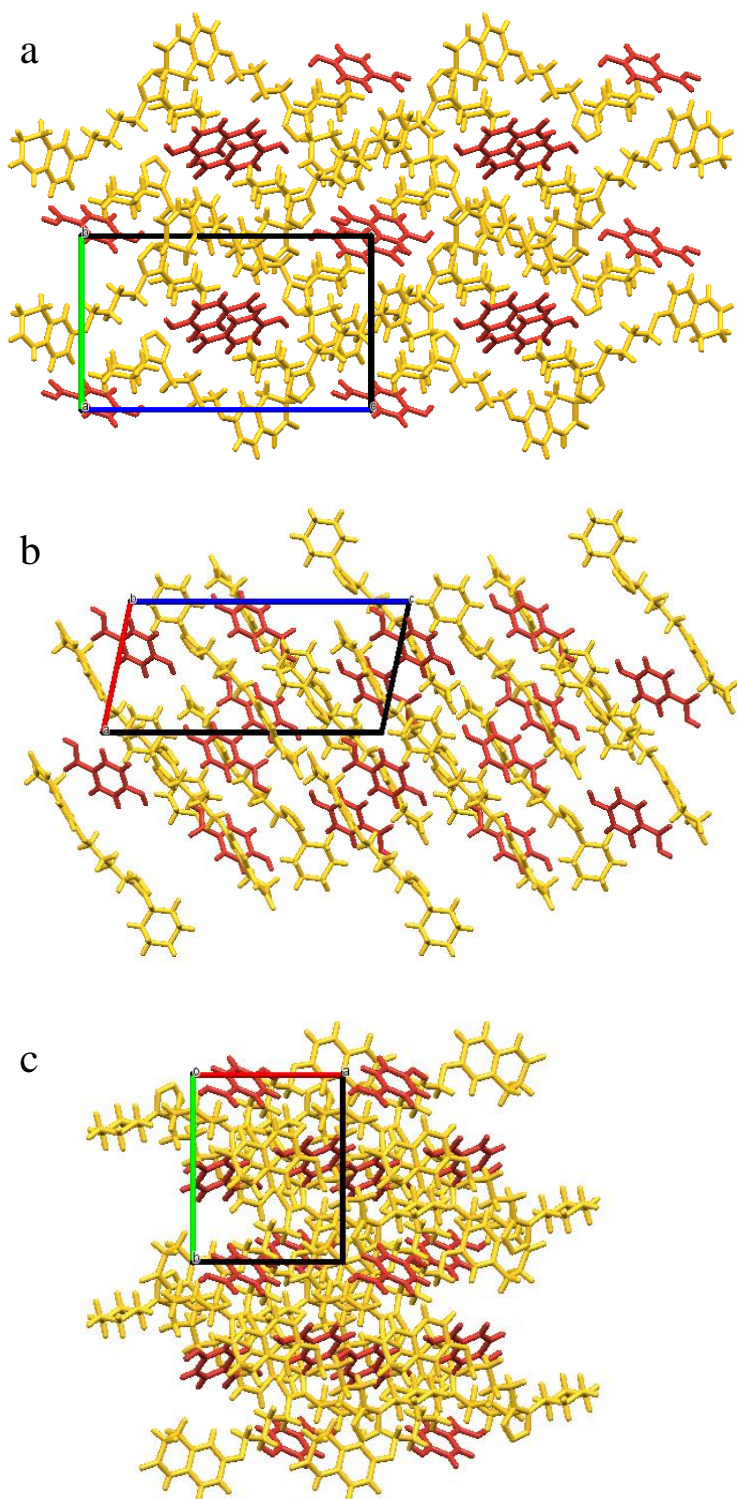


Figure S2. Crystal packing of CLZ-4HBA cocrystal, showing stacks of dimeric units (a) along the *a* axis, (b) along the *b* axis, and (c) along the *c* axis.

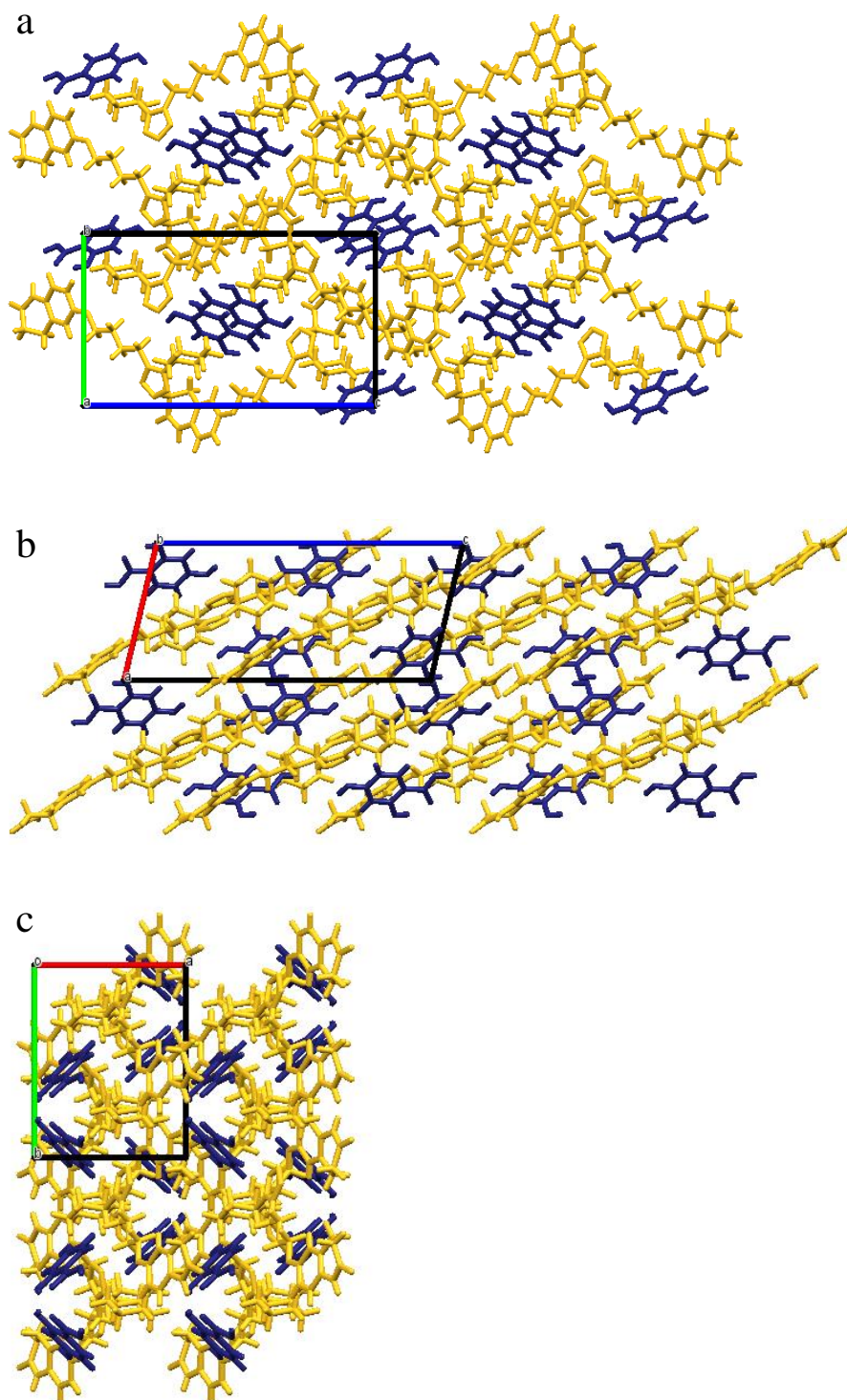


Figure S3. Crystal packing of CLZ-2,4DHBA cocrystal, showing stacks of dimeric units (a) along the *a* axis, (b) along the *b* axis, and (c) along the *c* axis.

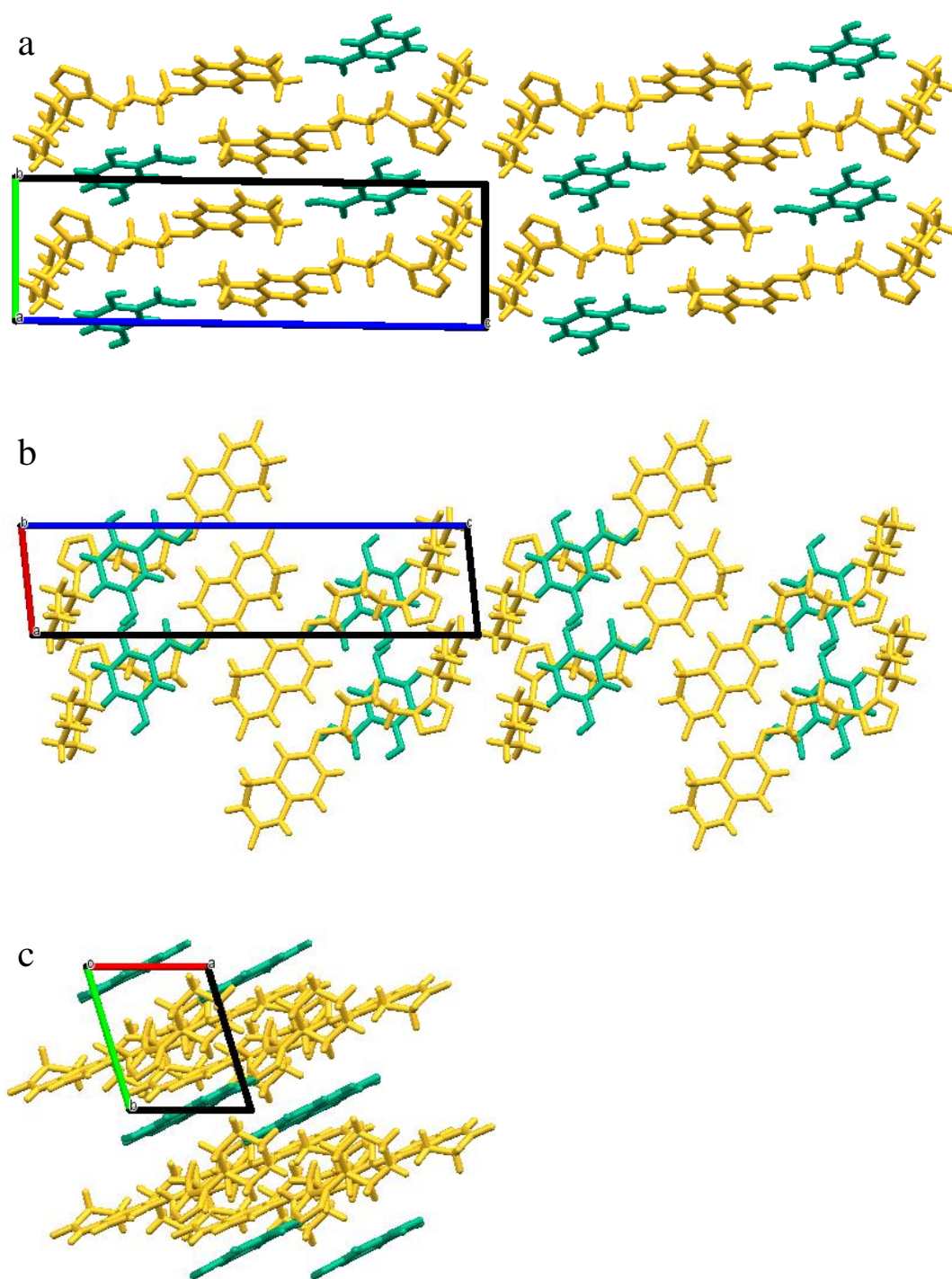


Figure S4. Crystal packing of CLZ-2,5DHBA cocrystal, showing stacks of dimeric units (a) along the *a* axis, (b) along the *b* axis, and (c) along the *c* axis.

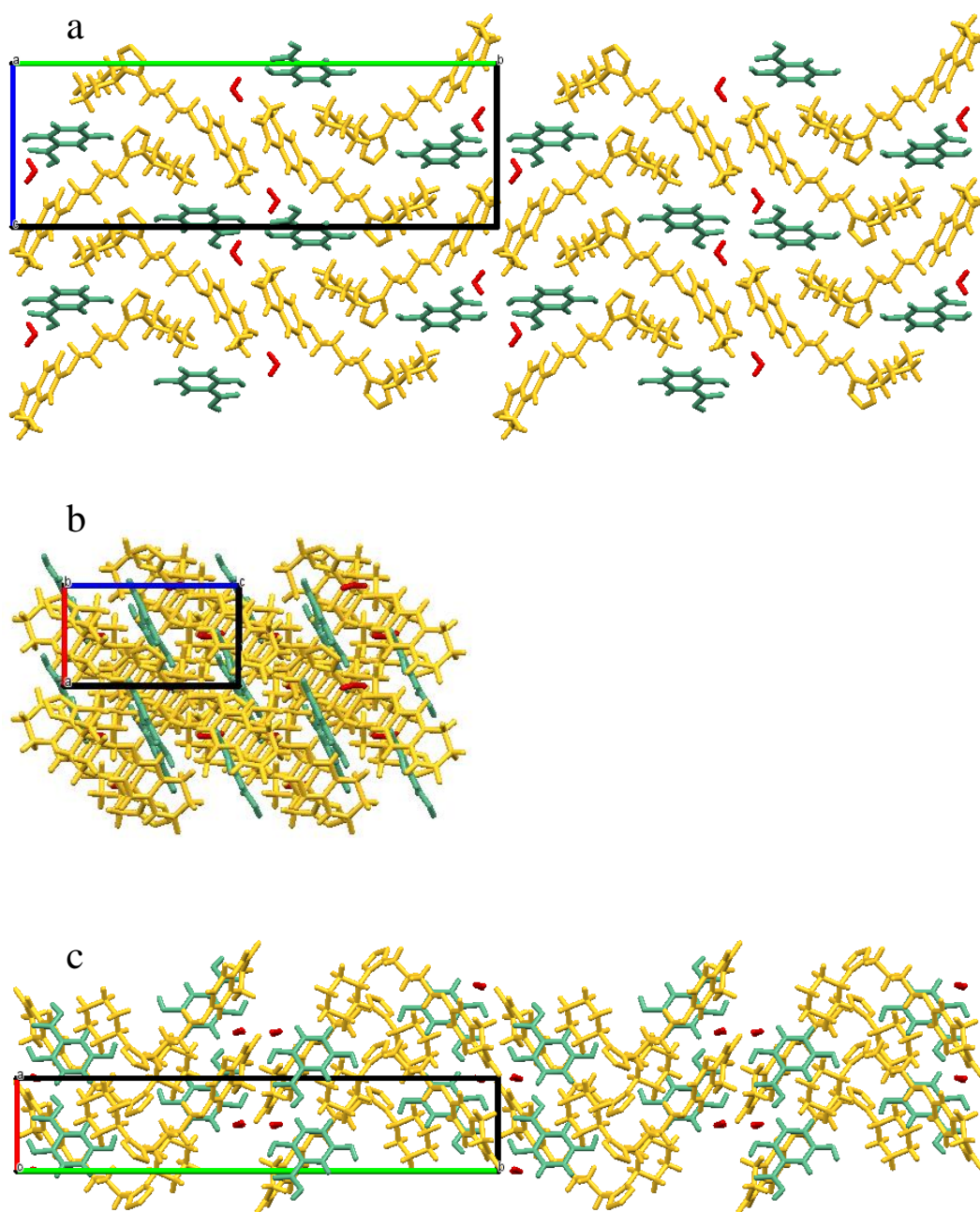


Figure S5. Crystal packing of CLZ-2,5DHBA-H₂O cocrystal, showing stacks of trimeric units (a) along the *a* axis, (b) along the *b* axis, and (c) along the *c* axis.