

## DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部  
研究者 阿曾幸男

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所薬品部 吉岡澄江

### 要旨

非ウイルス性の遺伝子ベクターとして注目されている DNA-カチオン性脂質複合体について、その凍結乾燥製剤の安定性に関する基礎的な知見を得ることを目的とし、そのモデルであるカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の保存安定性を明らかにし、安定性を支配する因子について考察した。

### 1. 研究目的

本研究はウイルスを用いずに遺伝子を標的細胞内に導入する手法として注目され、臨床試験等も行われている DNA-カチオン性脂質複合体製剤について、製剤を構成する分子の分子運動性に基づいて、製剤の保存安定性を評価する手法を開発し、製剤の実用化に向けた基盤的な知見を得ることを目的とする。ヒトの全遺伝子配列が解読され、遺伝子の機能や疾病との関連が明らかにされつつあり、それらの成果に基づいた新たな疾病治療法が試みられている。たとえば、血管壁増殖遺伝子の発現を制御する遺伝子部位に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを投与し、血管壁の増殖を抑制させることにより、心筋梗塞治療時の心血管バイパスの再狭窄を抑制する試みや、血管新生に関連する遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を投与し、動脈硬化を起こしている部位に新たな血管を生じさせ、血流障害を改善する試みが行われている。今後、DNA を有効成分とするさまざまな形の医薬品製剤が市販されるものと予想される。そのなかでもウイルスを用いない DNA-カチオン性脂質複合体は安全性の面でウイルスベクターに比べ優れており、また、非ウイルスベクターであるカチオン性高分子などに比べ、遺伝子導入効率が高いことから、最も有望視されているものであるが、これらの医薬品製剤における保存時の DNA-カチオン性脂質複合体の化学的あるいは物理的な安定性に関する知見は断片的なものに限られている。DNA を有効成分とする医薬品製剤が市販されるのに備え、DNA 医薬品の保存安定性に関する包括的な研究およびその研究を遂行する上で不可欠な DNA 医薬品の安定性評価法の開発は急を要することである。平成 13 年度は DNA-カチオン性脂質複合体の凍結乾燥製剤の調製に関する基礎的な知見を得ることを目的として、カチオン性脂質リポソームについて、糖や水溶性高分子を添加剤として用いた凍結乾燥製剤を調製し凍結乾燥による粒子径の増えを抑制する添加剤の検索を行ったところ、ショ糖やトレハロースなど糖類やデキストラン、アスパラギン誘導体などの水溶性高分子、ショ糖とデキストランの混合物が凍結乾燥時のカチオン性リポソームを安定化することを明らかにした。また、凍結乾燥時の凍結速度はカチオン性リポソームの粒子径に影響を及ぼさなかったが、製剤の保存安定性や外観が凍結速度に影響されることが明らかとなった。14 年度においては、DNA-カチオン性脂質複合体の凍結乾燥製剤の安定性に関する基礎的な知見を得ることを目的として、カチオン性リポソームの凍結乾燥製剤および DNA のモデルである polydeoxyadenylic acid とカチオン性リポソームの凍結乾燥製剤について、粒子径の変化を指標として保存安定性を明らかにし、保存安定性を支配する因子について考察した。具体的には以下の検討を行った。

- ①粒子径の変化を指標とした保存安定性に及ぼす添加剤の影響
- ②粒子径の変化を指標とした保存安定性に及ぼす製剤の凍結乾燥時の凍結速度の影響
- ③カチオン性リポソーム溶液の低温 DSC およびカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤のレオロジー特性の解析。

## 2. 研究方法

### 2.1 カチオン性リポソームの調製

N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTAP) 250mg とコレステロール 125 または 50mg をクロロホルムに溶解し、窒素気流によりクロロホルムを留去した。さらに、1 時間減圧にし、残留するクロロホルムを除いた。水 50ml を加え、50℃で 10 分間加温し、脂質を分散させた。孔径 0.6  $\mu\text{m}$  および 0.2  $\mu\text{m}$  のポリカーボネート製メンブランフィルターでろ過することにより、粒子径約 200nm のリポソームの溶液を得た。DNA のモデルとして Polydeoxyadenylic acid (Poly[dA])を用い、2 U/ml の濃度になるようにリポソーム溶液に添加した。

### 2.2 カチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の調製

凍結乾燥製剤の添加剤として、ショ糖、トレハロース、ショ糖-デキストラン混合物(2:1 および 1:1)を用いた。10w/v%の添加剤溶液と等量のリポソーム溶液を混合し、その溶液 500  $\mu\text{l}$  をポリプロピレン製のチューブに入れ、液体窒素に入れて急速に凍結するか、あるいは凍結乾燥機の棚で-10℃/h の速度で冷却し、凍結した。凍結した試料は約 5 Pa の減圧下、棚温度を-40℃で 24 時間、-20℃で 16 時間、0℃で 6 時間、20℃で 6 時間保持し、乾燥を行った。リポソーム凍結乾燥製剤は 25℃、23%RH で 1 日保存して水分量を調整した後、25 あるいは 50℃に保存し、再分散後リポソーム粒子径を測定するとともに、示差走査熱量計(DSC)により製剤の物理化学的特性の変化を明らかにした。

### 2.3 リポソーム粒子径測定法

カチオン性リポソームの凍結乾燥製剤を水 1mL に再分散し、動的光散乱法によって粒子径を測定した。Cone 粘度計を用いて溶液の粘度を測定し、溶液の粘度の影響を補正した。

### 2.4 ショ糖-カチオン性リポソーム水溶液の低温 DSC 測定

ショ糖-カチオン性リポソーム水溶液約 5  $\mu\text{L}$  をサンプルパンにはかり採り、DSC 装置の中で、0.2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の速度で-50  $^{\circ}\text{C}$  まで冷却するか、液体窒素に入れて急冷した後、-50℃から 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の速度で昇温し、氷の融解熱を測定した。また、凍結濃縮相のガラス転移温度( $T_g$ )を温度変調型 DSC(昇温速度：1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、温度変調幅： $\pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ 、温度変調周期：100 秒)によって測定した。

### 2.5 カチオン性リポソーム製剤のレオロジー特性の解析

コントロールドストレステオメーター(AR-1000 型、TA Instrument)を用いて、ショ糖を添加剤としたカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤について動的粘弾性率の測定を行った。凍結乾燥ケーキを厚さ 420~440  $\mu\text{m}$  に圧縮し試料とした。4cm の平行プレートを用い、一定の大きさ(40 Pa)の振動ストレスを試料に加えた。振動周波数 0.1 rad/s で、貯蔵弾性率および損失弾性率の温度変化(0-50℃)を測定した。また、30℃における貯蔵弾性率および損失弾性率の振動周波数依存性(0.01-100 rad/s)を明らかにした。

## 3. 研究成果

### 3.1 カチオン性リポソームの粒子径に及ぼす室温保存の影響

平成 13 年度にはカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤を 25℃、23%RH の条件で 1 日保存して水分含量を調整し、40℃あるいは 50℃の加速条件下で保存安定性を検討した。その結果、ガラス転移温度( $T_g$ )の最も高いデキストランを用いた製剤(112℃)は 40℃、20 日あるいは 50℃、7 日の保存によっても粒子径に変化は見られず、安定であった。それに対し、 $T_g$ の最も低いショ糖を用いた製剤(35℃)では 40℃あるいは 50℃での保存により、粒子径が 200nm から 400nm に増加した。カチオン性リポソーム製剤の保存による粒子径の変化の速度は  $T_g$ の高い製剤ほど小さく、保存安定性と  $T_g$ すなわちマトリックスの運動性との間に関連があることが示された。

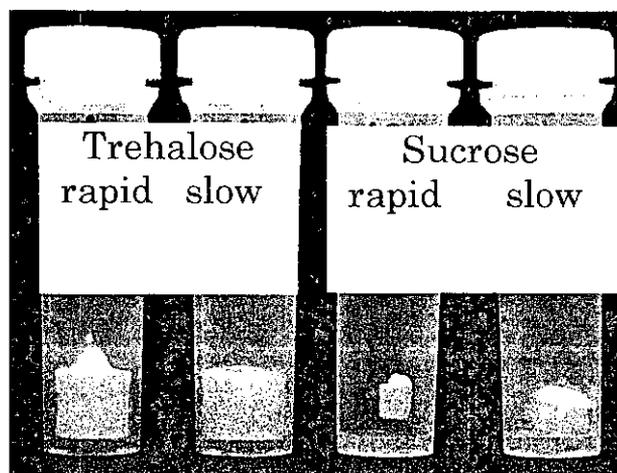


Fig. 1 Lyophilized cationic liposome formulations stored at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 1 year.

40 あるいは 50°C の加速条件下の保存によって  $T_g$  の低い製剤では凍結乾燥ケーキの収縮が起こった。そこで、本年度はケーキの収縮が起こらないと考えられる緩和な条件で長期間保存し、カチオン性リポソームの粒子径の変化について検討した。ショ糖製剤の  $T_g$  (35°C) より低い 25°C で、1 年間保存したところ、トレハロース ( $T_g$ : 50°C) やショ糖-デキストラン 2:1 ( $T_g$ : 46°C) およびショ糖-デキストラン 1:1 ( $T_g$ : 60) を添加した製剤では凍結乾燥ケーキの外観は保存前と変わらず、リポソームの粒子径も保存前と同じであり、安定であることが明らかになった。しかし、ショ糖を添加剤として用いた製剤においては  $T_g$  より低い温度に保存したにもかかわらず、ケーキが収縮し (Fig. 1)、リポソームの粒子径が増大した (Fig. 2)。DSC 測定の結果、保存したショ糖製剤にはガラス転移によるベースラインの変動や結晶化による発熱ピークが保存前の試料と同様に観測され、非晶質であった。したがって、ショ糖製剤においてリポソーム粒子径が増大した理由はショ糖の結晶化によるものではなく、保存温度 (25°C) とショ糖製剤の  $T_g$  (35°C) との差が小さく、 $T_g$  より低い温度であっても、ショ糖製剤がかなりの運動性を持つためと考えられる。カチオン性リポソーム凍結乾燥製剤を長期間安定に保存するためには製剤の  $T_g$  より十分低い温度で保存する必要があることが明らかになった。

### 3.2 Poly[dA] とカチオン性リポソームを含有する凍結乾燥製剤の調製

DOTAP を用いたカチオン性リポソームに 2U/ml になるよう Poly[dA] を添加し、ショ糖を添加剤として用いた凍結乾燥製剤を調製した。得られた凍結乾燥製剤を水に再分散させた時のリポソームの粒子径は Poly[dA] の存在によってほとんど変化しなかった。平成 13 年度の検討により、ショ糖が凍結乾燥によるカチオン性リポソームの凝集を抑制することを明らかにしたが、Poly[dA] 共存下においても凍結乾燥時のリポソームの凝集を抑制するが明らかとなった。

50°C で保存することにより、Fig. 3 に示すようにリポソーム粒子径の増大が見られた。Poly[dA] 含有する製剤のほうが粒子径の増大の程度が大きく、また、急速に凍結して調製した製剤のほうが粒子径の増大が短時間で起こり、不安定であった。

### 3.3 カチオン性リポソームの溶液の低温 DSC

凍結速度によって製剤の外観や保存安定性に差が生ずる理由を明らかにすることを目的として、リポソームとショ糖を含む水溶液の低温 DSC の測定を行った。-0.2°C/min の冷却速度で -50°C までゆっくり冷却して凍結させた溶液 (slow) と液体窒素に入れ

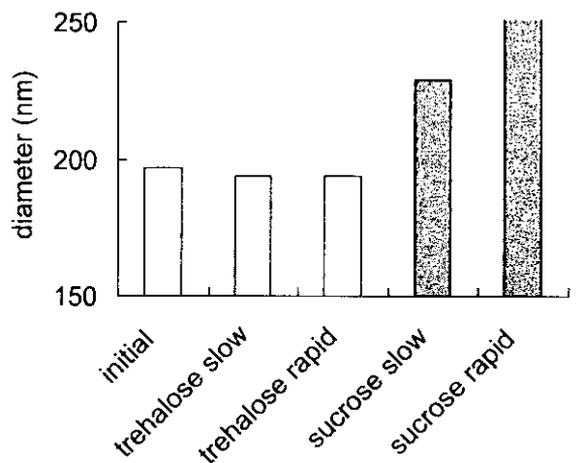


Fig. 2 Diameter of cationic liposome lyophilized with sucrose and trehalose. Lyophilized formulations were stored at 25 °C and 23%RH for 1 year.

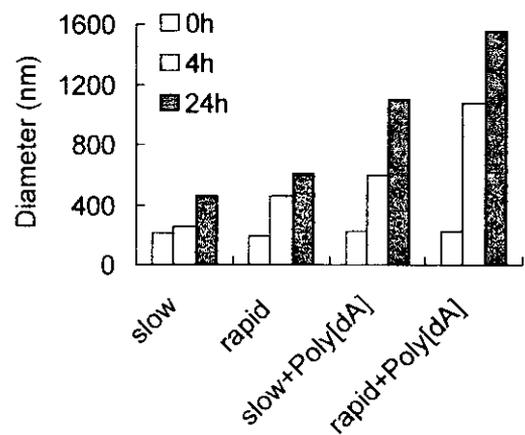


Fig. 3 Effect of storage on diameter of cationic liposome.

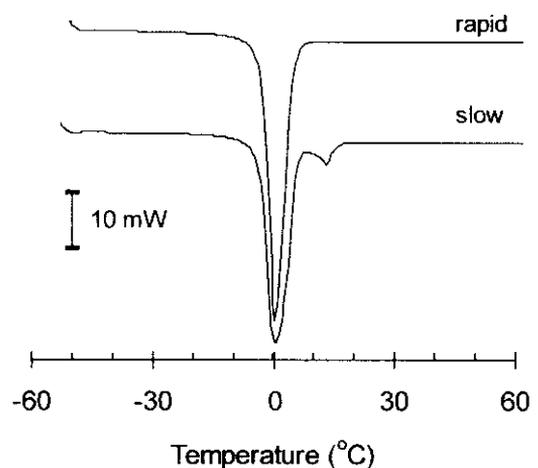


Fig. 4 Typical thermograms of sucrose-cationic liposome solution.

て急速に凍結した溶液(N<sub>2</sub>)のDSC曲線を Fig. 4 に示す。氷の融解熱は凍結速度によって大きな差は見られなかったが、-0.2°C/min の冷却速度でゆっくり冷却して凍結させた時の氷の融解ピークの形状は、液体窒素で急速に凍結した場合に比べロードであった。

また、温度変調型 DSC によって観測される凍結濃縮相のガラス転移温度( $T_g'$ )は Fig. 5 に示すように、急速に凍結したときには-36°Cであるのに対し、ゆっくり冷却した場合は-34°Cであった。また、 $T_g'$ における比熱の変化量はゆっくり冷却した場合のほうが大きかった。これらの結果はゆっくり凍結したほうが大きな氷晶が生成することに対応するものであり、凍結濃縮相におけるショ糖濃度が高いことを意味するものと考えられる。

### 3.4 カチオン性リポソーム-ショ糖凍結乾燥製剤のレオロジー特性の解析

平成 13 年度の検討結果、40 あるいは 50°Cでの保存により、液体窒素を用いて急速に凍結した製剤に比べ、-10°C/h の冷却速度でゆっくり凍結した製剤の方が保存による粒子径の増加が小さく、安定であることが明らかになった。本年度得られた 25°Cでの保存した試料に関する結果からも、凍結速度によって保存安定性に差があり、また、凍結乾燥ケーキの収縮の度合いに差があることが明らかになった。凍結速度によって保存安定性や凍結乾燥ケーキの収縮に差が生ずる理由を明らかにすることを目的として、凍結乾燥製剤のレオロジー特性の解析を行った。ショ糖を添加剤として用いたカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の動的粘弾性率を測定した結果、凍結速度によって製剤のレオロジー特性の温度変化に差が見られた。

Fig. 6 に示すように、弾性率( $G'$ )は低温の温度領域では温度上昇とともに徐々に減少し、ある温度を超えると急激に減少した。損失弾性率( $G''$ )は低温の温度領域では温度上昇とともに大きくなり、 $G'$ が急激に減少する温度付近で極大となり、さらに温度が上昇すると減少した。 $G''$ が極大となる温度は急速に凍結した製剤にくらべ、ゆっくり凍結した製剤のほうが約 5°C高かった。すなわち急速に凍結した製剤はゆっくり凍結した製剤よりも低い温度で軟化することが明らかとなった。30°Cで測定した  $G''$ の周波数依存性は Fig. 7 に示すように、急速に凍結した製剤では 2 rad/s に、ゆっくり凍結した製剤では 0.4 rad/s に極大が見られた。したがって、急速に凍結した製剤のほうがマトリックスの運動性が高いことが明らかとなった。この高い運動性がカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の保存安定性を支配しているものと考えられる。また、レオロジー特性からみた製剤マトリックスの運動性の差は凍結濃縮相におけるショ糖濃度の違いによって生じたものと考えられる。凍結乾燥製剤の物理化学的な特性の中で  $T_g$  が保存安定性に大きく影響するといわれているが、レオロジー特性からみた製剤マトリックスの運動性も凍結乾燥製剤の保存安定性を評価する上で有用な指標となることが明らかとなった。

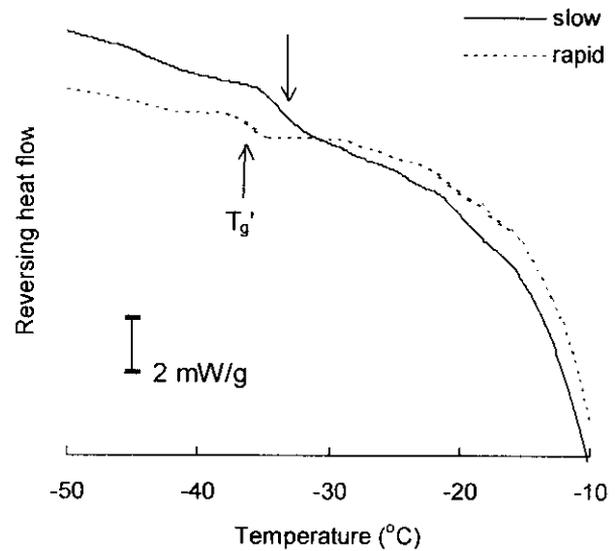


Fig. 5 Effect of cooling rate on the  $T_g'$  of cationic liposome-sucrose solution.

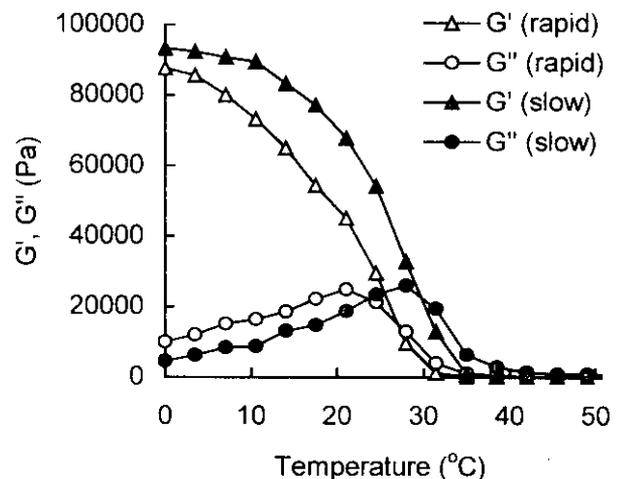


Fig. 6 Temperature dependence of dynamic shear modulus ( $G'$ ,  $G''$ ) of cationic liposome-sucrose formulations. Oscillation frequency: 0.1 rad/s

#### 4. 考 察

平成 13 および 14 年度にカチオン性リポソームの凍結乾燥製剤およびカチオン性リポソームと Poly[dA] を含有する凍結乾燥製剤について行った基礎的検討により、DNA-カチオン性脂質複合体の凍結乾燥製剤の保存安定性を考察する上で、有用な知見を得ることができた。保存によるリポソームの粒子径の増加の速度が製剤の  $T_g$  すなわち運動性と関連することが示され、 $T_g$  の高い添加剤とともに凍結乾燥することにより安定な製剤が作成できることが明らかになった。また、凍結乾燥時の凍結速度によって製剤の保存安定性に差があることが明らかになった。レオロジー特性からみたシヨ糖製剤マトリックスの運動性が凍結速度によって異なることが示され、この運動性の違いがカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の保存安定性を支配していることが示された。凍結乾燥製剤の保存安定性を評価する上で  $T_g$  を指標

とする場合が多いが、レオロジー特性からみた製剤マトリックスの運動性も凍結乾燥製剤の保存安定性を評価する上で有用な指標となることが明らかとなった。我々は既に、非晶質薬物の結晶化速度が運動性に基いて予測できることを示唆する知見を得ている。DNA-カチオン性脂質複合体の凍結乾燥製剤に関しても非晶質医薬品の結晶化と同様な取り扱いによって、安定性予測が可能であることを明らかにすることは今後検討すべき研究課題と考える。そのためには凍結乾燥製剤の分子運動性を明らかにする必要がある。分子運動性はさまざまな手法によって評価することができるが、手法によって検出される分子運動の時間スケールは異なる。今後、レオロジー特性からみた製剤マトリックスの運動性を中心に、NMR 緩和時間、誘電緩和時間、エンタルピー緩和時間などさまざまな時間スケールの分子運動性を評価する手法によってカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の分子運動性を明らかにし、保存安定性と最もよく関連する分子運動性を明らかにし、分子運動性に基づく DNA-カチオン性脂質複合体の保存安定性予測の可能性を明らかにする。また、DNA-カチオン性脂質複合体の凍結乾燥製剤の保存安定性を考察する上で、リポソームの粒子径の安定性とともに、DNA の保存安定性を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。DNA のモデルとして用いた Poly[dA] について分子量など指標にして保存安定性を明らかにすることも検討すべき課題と考える。

#### 5. まとめ

- (1) シヨ糖を添加剤として用いることにより、DNA とカチオン性リポソームの複合体を安定に凍結乾燥できることが明らかとなった。
- (2) カチオン性リポソームとシヨ糖の水溶液について行った低温 DSC による検討の結果、ゆっくり凍結したほうが大きな氷晶が生成し、凍結濃縮相におけるシヨ糖濃度が高いことが明らかになった。
- (3) 製剤の  $T_g(35^\circ\text{C})$  より低温の保存条件であっても長期間保存すると、凍結乾燥ケーキの収縮およびリポソーム粒子径の増大が見られた。カチオン性リポソーム凍結乾燥製剤を長期間安定に保存するためには製剤の  $T_g$  より十分低い温度で保存する必要があることが明らかになった。
- (4) 凍結方法による保存安定性の差が製剤のレオロジー特性に基づく分子運動性の違いによって説明することができた。レオロジー特性からみた製剤マトリックスの運動性も凍結乾燥製剤の保存安定性を評価する上で有用な指標となることが明らかとなった。

#### 6. 研究発表

- 1) Y. Aso, S. Yoshioka, S. Kojima, Molecular mobility-based prediction of the crystallization rate of amorphous nifedipine and phenobarbital in PVP solid dispersions. *J. Pharm. Sci.*, submitted.

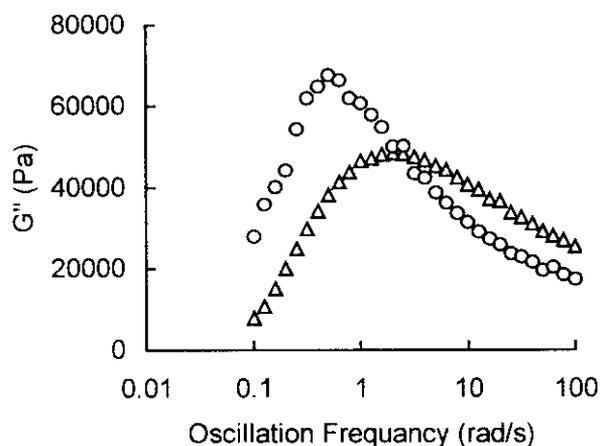


Fig. 7 Loss modulus ( $G''$ ) of cationic liposome-sucrose formulations as a function of oscillation frequency. Temperature:  $30^\circ\text{C}$ .  $\Delta$ : rapid.  $\circ$ : slow.

- 2) S. Yoshioka, Y. Aso, Shigeo Kojima, Prediction of glass transition temperature of freeze-dried formulations by molecular dynamic simulation. *Pharm. Res.*, accepted (2003).
- 3) S. Yoshioka, Y. Aso, Shigeo Kojima, Different molecular motions in lyophilized protein formulations as determined by laboratory and rotating frame spin-lattice relaxation times. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 2203-2210 (2002).
- 4) Y. Aso, S. Yoshioka, J. Zhang, G. Zografi, Effect of water on the molecular mobility of sucrose and PVP in a colyophilized formulation as measured by <sup>13</sup>C-NMR relaxation time. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 822-826 (2002).
- 5) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, N. F. Cappuccino, A comparison of the analysis of covariance (ANCOVA) and range-based approaches for assessing batch-to-batch variability of the stability of pharmaceutical products. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 881-883 (2002).
- 6) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄, 凍結乾燥製剤の安定性に及ぼす水の影響, 低温生物工学会誌、**48**,42-46 (2002).

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし