

Fig. 14 T_g of Plasmid DNA-liposome formulations.

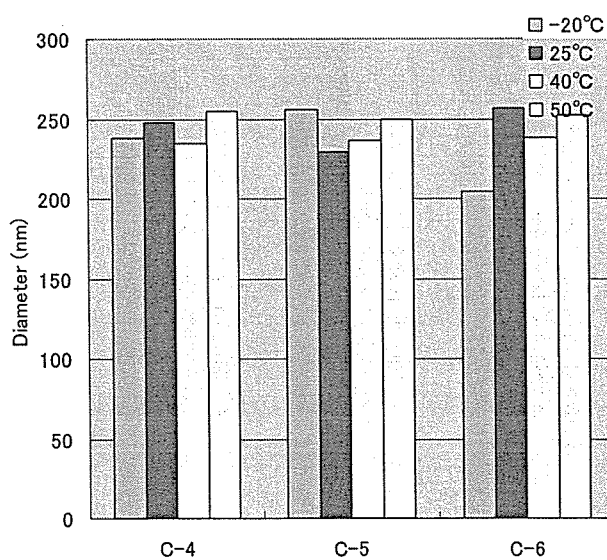
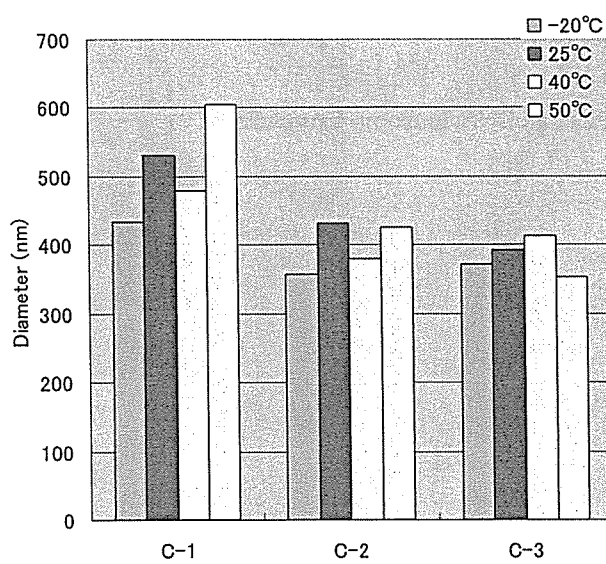
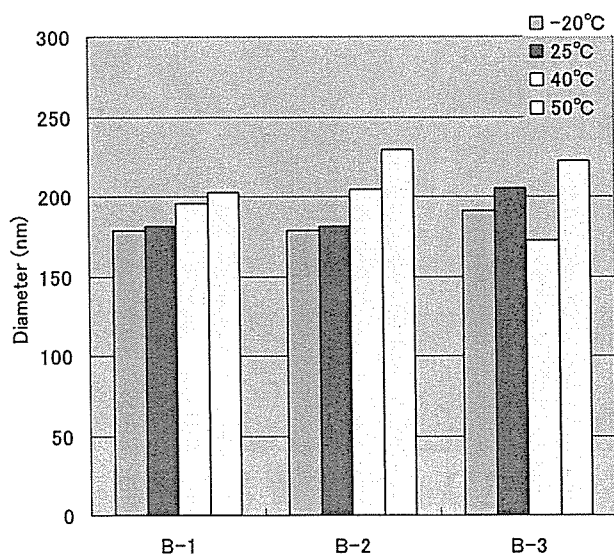


Fig.15 Particle size of liposomes after rehydration of lasmid DNA-liposome formulations stored at various temperature for 50 days.

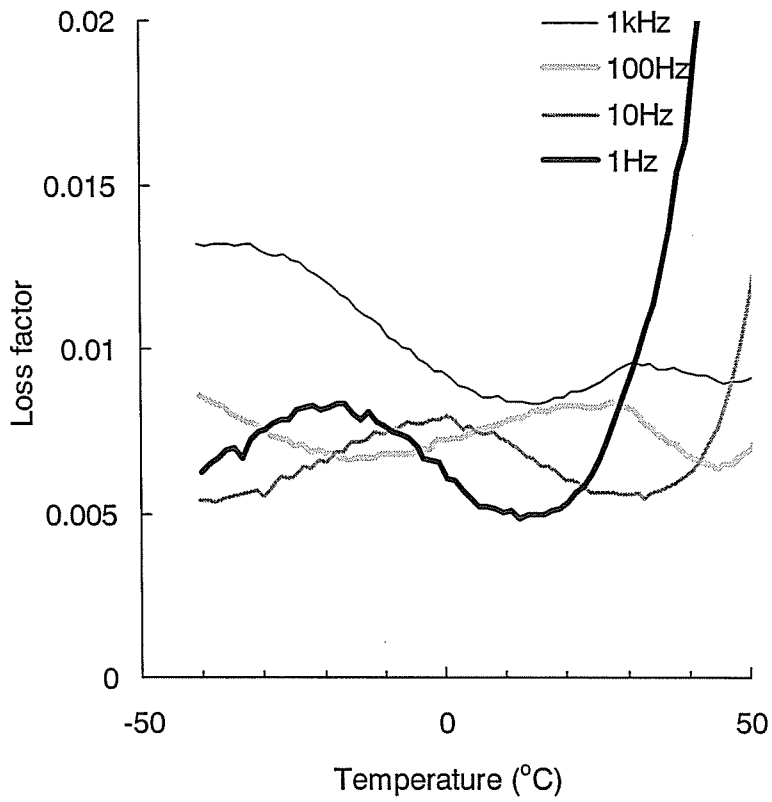


Fig. 16 Temperature dependence of loss factor of freeze-dried sucrose.

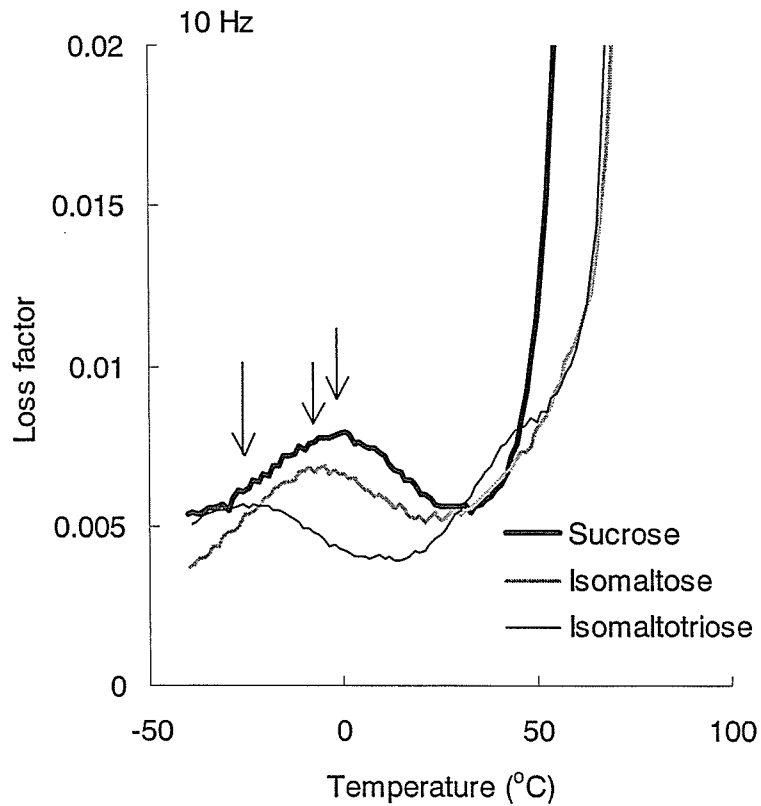


Fig.17 Temperature dependence of β -relaxation of freeze-dried sucrose, isomaltose and isomaltotriose.

凍結乾燥再水和調製法による遺伝子導入製剤の安定性に対する糖の影響

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所 教授

これまでのリポソーム遺伝子導入製剤では、DNA と混合したときのリポソーム/DNA 複合体の凝集や遺伝子導入効率の低下が問題となっている。そのためリポソーム懸濁液に DNA を用時に添加して複合体を調製し、遺伝子導入製剤としてきた。凍結乾燥再水和法で調製した遺伝子導入製剤は、凍結時に添加する糖の種類によって製剤の分散性および遺伝子導入効率が異なり、ショ糖を用いて凍結乾燥した遺伝子封入リポソーム(DC-Chol/DOPE=1/2)製剤が最も高い遺伝子発現効率を示した。この製剤は50℃で50日間保存しても、用時調製リポソームベクターとほぼ同等の高い遺伝子導入効率を示すことを明らかにした。また、T_gの低いショ糖がDNAに対して最も高い安定化作用を示したことから、糖はリポソームのマクロな安定性に寄与しているのではなく、DNAの局所の安定性に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、遺伝子導入用リポソームベクターはリポソーム懸濁液で、遺伝子との複合体は用時調製して用いられており、遺伝子封入製剤は未だ市販されていない。これは、DNAは熱力学的に不安定で凝集等の物性変化を起こしやすいため、遺伝子封入製剤の安定性に問題があるためである。使用の簡便性や品質管理、大量生産などから、安定性の高い遺伝子封入製剤が望まれている。

凍結乾燥では、トレハロースを代表とするガラス転移温度(T_g)の高い糖類がリポソームの内外液に存在すると、リポソームの凍結乾燥製剤の安定性を維持することが知られている。一方、リポソームへの薬物封入法の一つである凍結乾燥再水和法では、少量の糖類を外液に添加するとリポソーム膜が乱され、サイズの小さい薬物封入リポソームが調製できることが報告されている。

そこで、これまでにT_gの異なる3種類の糖を用いて凍結乾燥再水和法によって調製した遺伝子封入リポソーム製剤を、糖が製剤の物理化学的性質(T_g、溶解性、サイズ)と遺伝子発現効率に及

ぼす影響を調べたが、室温保存では遺伝子導入効率に大きな影響はなかった。

本年度は安定性の高いDNA導入製剤の開発を目指して、これまでに決定したリポソームの組成比、リポソームとDNAの混合比(荷電比)、T_g温度の異なる糖を用いて、凍結乾燥再水和法によって調製したプラスミドDNA封入リポソーム製剤を各温度で保存して、糖が製剤の物理化学的性質と遺伝子導入効率に対する影響を調べた。

B. 研究方法

凍結乾燥再水和法調製リポソームへの糖の影響

卵黄レシチンEPCとコレステロールCholがモル比で2:1のリポソームを薄膜法で調製し、この全脂質と同質量のショ糖を添加し、凍結乾燥再水和や凍結融解を行い、リポソームのサイズを測定した。

遺伝子封入リポソームの溶解性

DC-Chol:DOPE(モル比3:2、1:2)からなる正電荷リポソームは薄膜法によって調製した。

凍結乾燥再水和法による遺伝子封入リポソーム製剤は、リポソーム懸濁液に質量比で全脂質:添

加剤 1:5 になるように、Sucrose、Isomaltose あるいは Isomaltotriose を加えて溶解させた後、正電荷リポソームと DNA の (+/-) の荷電比が 2:1、16:1 になるようにプラスミド DNA を添加した。この懸濁液を 1 チューブあたりの DNA が約 1 mg になるように分注し、液体窒素で急速凍結した後、凍結乾燥した。これらの凍結乾燥製剤を -20°C 、 25°C 、 40°C 、 50°C で 50 日間保存した。

得られた凍結乾燥製剤を各 $100\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $800\mu\text{L}$ と合計 1 mL の水で vortex をかけながら再水和し、リポソーム懸濁液の分散性と粒子サイズを測定した。

遺伝子封入リポソームの遺伝子封入率および遺伝子導入率の測定

遺伝子封入率は、再水和したリポソーム懸濁液を $45,000 \times g$ で 45 分間超遠心し、上清中のプラスミド DNA をリポソームに未封入として、PicoGreen dsDNA 法によって測定した。

遺伝子としては、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA、細胞は HeLa 細胞を用いた。遺伝子導入率は、再水和した遺伝子封入リポソーム製剤懸濁液を上記の通り遠心してペレットとし、これを水で DNA $100\mu\text{g}/\text{mL}$ に再分散させた。この懸濁液を 1 ウェルあたり $2\mu\text{g}$ DNA となるように添加して、3 時間無血清培地で、その後 21 時間 10%FBS 含有培地でインキュベーションし、ルシフェラーゼ発現量をピカジーンを用いて測定した。

遺伝子導入リポソーム製剤の細胞毒性

遺伝子発現時の HeLa 細胞のタンパク質濃度測定から評価した。

C. 研究結果

凍結乾燥再水和法調製リポソームのサイズに対する糖の影響

リポソーム懸濁液を凍結乾燥再水和すると、リポソーム (MLV) が凝集することと、ショ糖を再水

和時に添加するとその凝集を促進することを明らかにした (Fig. 1)。次に、懸濁液の急速凍結によってリポソームのサイズは小さく維持できることと、ショ糖はリポソームの凍結時に添加すると、さらにサイズが小さいことを明らかにした (Fig. 2)。

遺伝子導入用ベクターでは、前年度の実験結果から、リポソーム組成としては、高い遺伝子発現を示した DC-Chol と DOPE のモル比 3:2、1:2 の 2 種類を、粒子径の小さいリポソームを調製するために糖の添加量は、全脂質の 5 倍量添加することにした。

DNA はリポソームに対して (+/-) 荷電比が 2:1、16:1 となるように添加し、さらに 3 種類の糖を添加して凍結乾燥再水和法によって DNA 封入リポソーム製剤を調製した (Table 1)。調製時のリポソームのサイズは約 200nm であった。

糖の遺伝子導入リポソーム製剤の物性への影響

再水和後のリポソームのサイズは $\text{DC-Chol}/\text{DOPE}=3/2 < \text{DC-Chol}/\text{DOPE}=1/2 (+/-) 16 < \text{DC-Chol}/\text{DOPE}=1/2 (+/-) 2$ の順に大きくなったが、糖の影響はほとんどなかった (Table 2)。

凍結乾燥製剤の安定性は -20°C (コントロール)、 25°C 、 40°C 、 50°C で 50 日間保存して調べた。再水和後のリポソーム懸濁液の分散性を検討した結果、DC-Chol/DOPE (1:2) リポソームは DC-Chol/DOPE (3:2) に比べて、分散性が低下し、特に isomaltotriose を添加した製剤で不均一な分散が観察された (Table 3)。これはリポソームの正電荷に対する DNA の荷電比が 2 であるので、DC-Chol/DOPE (1:2) では全脂質あたりの DNA 量が多くなり、DNA が凝集し不安定になったと考えられる。

ガラス転移温度 (T_g) は sucrose では 80°C 、isomaltose では 105°C 、isomaltotriose では 130°C であり、 T_g が高い糖を添加すると保存温度

が Tg 以下の温度では、製剤はガラス状態でありリポソームは安定に存在すると考えられるが、分散性は Tg の高い isomaltotriose で低下する結果となった(Fig. 3, Fig.4)。

遺伝子導入リポソーム製剤の遺伝子封入率と遺伝子導入効率

添加した糖による遺伝子封入率への影響を検討した結果、どの製剤も保存温度によらず遺伝子の封入効率は 100%近い値を示した。これはリポソーム懸濁液では、遺伝子が正電荷のリポソームに封入および吸着していることを示唆した。

なお、これまでの実験結果より、遺伝子導入効率の実験では、各糖の細胞の等張化への影響はないことがわかっている。

リポソームの脂質組成と、リポソームと DNA の(+/-)荷電比の遺伝子導入効率に対する影響を検討した。その結果、コントロールである -20℃ で最も高い遺伝子発現効率を示す脂質組成は、DC-Chol:DOPE=1:2 で、(+/-)荷電比は 2:1 であった。また、(+/-)荷電比 16:1 では、DC-Chol:DOPE=1:2 のリポソームが DC-Chol:DOPE=3:2 より、高い遺伝子導入効率を示した(Fig. 5)。しかし、このとき糖の種類の影響はほとんどないことが明らかになった。

糖の製剤保存安定性への影響を遺伝子導入効率から調べた。温度による遺伝子発現効率の低下率は、isomaltotriose < isomaltose < sucrose の順に低くなった(Fig. 6)。

また、コントロールである -20℃での保存製剤に対する比で比較すると、DC-Chol/DOPE (1:2)リポソームでショ糖添加である C-1 製剤では、遺伝子の導入効率が 50℃で 50日間保存においてもほとんど変わらないことから、安定であることが明らかになった。

この C-1 製剤は、50℃で 50日間保存したとき、市販品のリポフェクタミン 2000 の 1/7 の遺伝子導入効率を示した。なお、同じ脂質組成と荷電比のリポソームと遺伝子との用時調製製剤では、遺伝子導入効率はリポフェクタミン 2000 の 1/3 であった。

遺伝子導入リポソーム製剤の細胞毒性

遺伝子発現時の細胞のタンパク質量から細胞毒性を評価すると、すべての遺伝子導入製剤で導入した細胞のタンパク質濃度は、市販のリポフェクタミン 2000 より高く、細胞毒性は低いことが明らかになった(Fig. 7)。

D. 考察

遺伝子導入リポソーム製剤は、リポソームの脂質組成や DNA との荷電比からはよく研究されているが、遺伝子を封入したりリポソーム製剤の保存安定性に対する糖の影響を調べた報告はほとんどない状況である。本研究は、Tg の異なる 3種の糖が、リポソーム組成と荷電比の異なる製剤の遺伝子導入効率に対する影響を保存温度を変えることにより明らかにした。

リポソームは凍結や凍結乾燥再水和すると、凝集が起こることから、ショ糖の添加を検討した。ショ糖にはリポソームの凝集抑制作用があり、その作用が働くのは凍結時であり、再水和時では逆に凝集を促進することが明らかになった。

DNA を空リポソームとともに凍結乾燥後、再水和すると DNA が封入され、リポソームの粒子径が大きくなることは、一時的にリポソーム膜が不安定化し DNA の透過性が上昇するか、リポソームの融合が起きていると考えられる。また、凍結によって破壊されたりリポソームの膜構造は再水和時に再構築が起き、そのとき水とともに DNA がリポソーム内に進入する可能性もある。また、リン脂質の分子運動性は、水の分子運動性が変化する凍結、乾燥、再水和時に大きく影響され、凍結時にトレハロースなどの糖を入れると、糖がガラス状態となり、脂質膜が安定化されることが報告されている。すなわち、糖は脂質膜の安定化作用と、一時的な不安定化作用があると推察される。

本研究から、糖は再水和後のリポソームの分散性と、製剤の温度安定性に大きな影響を与えることが明らかになった。一方、遺伝子導入効率には糖は影響せず、リポソームの脂質組成と荷電比が大きく寄与することが明らかとなった。

これまでは、糖はリポソームの凍結時に作用し

て、再水和後のリポソームの粒子径は、シヨ糖添加では小さくなることを報告してきたが、本研究では糖の種類によらず、脂質組成と荷電比の影響が大きくなった。

遺伝子封入リポソーム(DC-Chol:DOPE=1:2、(+/-)荷電比=2:1)でシヨ糖を添加した製剤が、高い遺伝子導入効率を示した。この結果から、シヨ糖はガラス転移温度がこの糖の中では最も低いことから、糖は、自分自身がガラス状態となり、リポソーム脂質膜が安定化するというマクロなリポソームの安定性に寄与しているのではなく、DNAとの局所な水素結合等の相互作用によってDNAの安定性に寄与している可能性が示唆された。

現段階ではリポソームの外側に静電的に吸着したDNAと、リポソーム内のDNAとを完全に分離定量できないので、糖がリポソーム内への遺伝子の封入に影響し、リポソーム内遺伝子が製剤の安定性に寄与しているかが明確ではない。しかし、この場合も糖が脂質に一時的な不安定化に作用したことがDNAの安定性に間接的に寄与した可能性を示している。

E. 結論

これまでのリポソーム遺伝子導入製剤は、DNAの活性低下、すなわち、遺伝子導入効率の低下や凝集が問題となっている。そのため、リポソーム懸濁液に必要時にDNAを添加し、リポソーム/遺伝子複合体を調製して用いてきた。本研究の結果より、シヨ糖を用いて凍結乾燥した遺伝子封入リポソーム(DC-Chol/DOPE=1/2)製剤は高いDNA活性を保持しており、50℃で50日間保存しても、用時調製リポソームベクターとほぼ同等の高い遺伝子導入効率を示し、遺伝子導入用製剤として有用性が高いことを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P.

Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of stability *in vitro* and *in vivo*, *Int. J. Pharm.*, 308:183-189(2006).

2. L. Feng, X. R. Qi, X. J. Zhou, Y. Maitani, S. C. Wang, Y. Jiang, T. Nagai, Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres, *J Control Release. J Control Release.* 112(1):35-42, (2006).
3. M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Design, synthesis and gene delivery efficiency of novel oligo-arginine linked PEG-lipids: effect of oligo-arginine length. 316(1-2): 109-116 (2006).
4. Y. Hiruta, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Obata, Y. Maitani, Novel ultra-deformable vesicles entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin, *J Control Release.*, 113: 146-1542 (2006).
5. K. Kawano, M. Watanabe, T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles, *J Control Release.*, 112: 329-332 (2006).
6. T. Yoshitomi, S. Yabuki, H. Kawakami, R. Sato, K. Toma, M. Furuhashi and Y. Maitani, The structure of artificial lipids possessing oligo(ethylene glycol) and their behavior in water. *Colloids and Surfaces A.*, 284-285: 276-283, (2006).

7. S. Igarashi, Y. Hattori and Y. Maitani, Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic, *J Control Release*. 112: 362-368 (2006).
 8. M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Intracellular delivery of proteins in complexes with oligoarginine-modified liposomes and the effect of oligoarginine length, *Bioconjugate Chemistry*, 17: 935-942 (2006).
 9. Y. Hattori and Y. Maitani, Two-step transcriptional amplification-lipid-based nanoparticles using PSMA or midkine promoter for suicide gene therapy in prostate cancer. *Cancer Science*. 97: 787-798 (2006).
 10. K. Hayashi, JB Lee, Y. Maitani, N. Toyooka, H. Nemoto, T. Hayashi, The role of a HSV thymidine kinase stimulating substance, scopolamine, in improving the efficacy of cancer gene therapy. *J Gene Med*. 8(8):1056-67 (2006).
 11. Y. Maitani, S. Yano, Y. Hattori, M. Furuhashi, Y. Hayashi, Liposome vector containing biosurfactant-complexed DNA as herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery system. *J Liposome Res*. 16:359-342 (2006).
 12. M. Fukushima, Y. Hattori, T. Yoshizawa, Y. Maitani. Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice. *International Journal of Oncology*, 30:225-231 (2007).
2. 学会発表
 1. 梶原栄一、福島正義、川野久美、服部喜之、林京子、米谷芳枝 ガンシクロビル封入血中滞留性リポソーム製剤の調製と評価 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
 2. 大口裕規乃、米谷芳枝 アクラシノマイシン A 封入葉酸修飾マイクロエマルジョンの in vivo 及び in vitro における癌ターゲットイニング能の評価 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
 3. 福島正義、服部喜之、米谷芳枝 前立腺癌に対するドセタキセル併用コネキシン 43 遺伝子治療の検討 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
 4. 服部喜之、米谷芳枝 葉酸修飾脂質微粒子ベクターの遺伝子導入効率における塩濃度の影響 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 5. 川野久美、米谷芳枝 腫瘍選択的葉酸修飾ドキソルビシン封入りリポソームの設計と評価 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 6. 片山明香、川野久美、戸潤一孔、米谷芳枝 カンプトテシン封入りリポソーム製剤における安息香酸誘導体の影響 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 7. 藤田堯志、古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝 オリゴアルギニン修飾リポソームベクターの開発 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 8. 山田敦史、川野久美、米谷芳枝 葉酸修飾リポソームによる細胞内薬物送達におけるポ

リエチレングリコール脂質の影響 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)

A Satellite Meeting of International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4th Peptide Engineering Meeting, (2006.11)

9. 吉澤隆、服部喜之、米谷芳枝 PEG 修飾脂質微粒子 siRNA ベクターの開発 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
10. Y. Hattori and Y. Maitani, Tumor-specific two-step transcriptional amplification for non-viral suicide gene therapy of prostate cancer, The 1st FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery, (2006. 7)
11. M. Furuhata, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori and Y. Maitani, Intracellular delivery of plasmid DNA using oligoarginine modified micelles and liposomes, The 1st FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery, (2006. 7)
12. 古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝 オリゴアルギニン修飾ベクターによる遺伝子導入 第 22 回日本 DDS 学会 (2006. 7)
13. 羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、川野久美、米谷芳枝 カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾方法の検討 第 22 回日本 DDS 学会 (2006. 7)
14. 服部 喜之、米谷 芳枝 2 段階遺伝子転写増幅法による脂質微粒子遺伝子ベクターを用いた前立腺癌特異的自殺遺伝子治療の評価, 日本癌学会 第 65 回総会 (2006.9)
15. M. Furuhata, H. Kawakami, K. Toma, Y. Yamada, Y. Hattori and Y. Maitani, Oligoarginine modified liposome and micelle vector complex with plasmid DNA for gene delivery, Membrane-permeable peptides: Chemistry, biology and therapeutic applications, A Satellite Meeting of International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4th Peptide Engineering Meeting, (2006.11)
16. 羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、川野久美、米谷芳枝 カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾法の検討と in vivo 評価 日本薬学会第 127 年会(2007.3)
17. 山田敦史、川野久美、服部喜之、米谷芳枝 ドキソルビシン封入葉酸修飾リポソームの抗腫瘍効果における PEG 脂質の影響 日本薬学会第 127 年会(2007.3)
18. 吉澤隆、服部喜之、米谷芳枝 葉酸受容体選択性 siRNA 遺伝子ベクターの開発 日本薬学会第 127 年会(2007.3)
19. 藤田堯志、古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝 In vivo 用オリゴアルギニン脂質ベクターの開発 日本薬学会第 127 年会(2007.3)

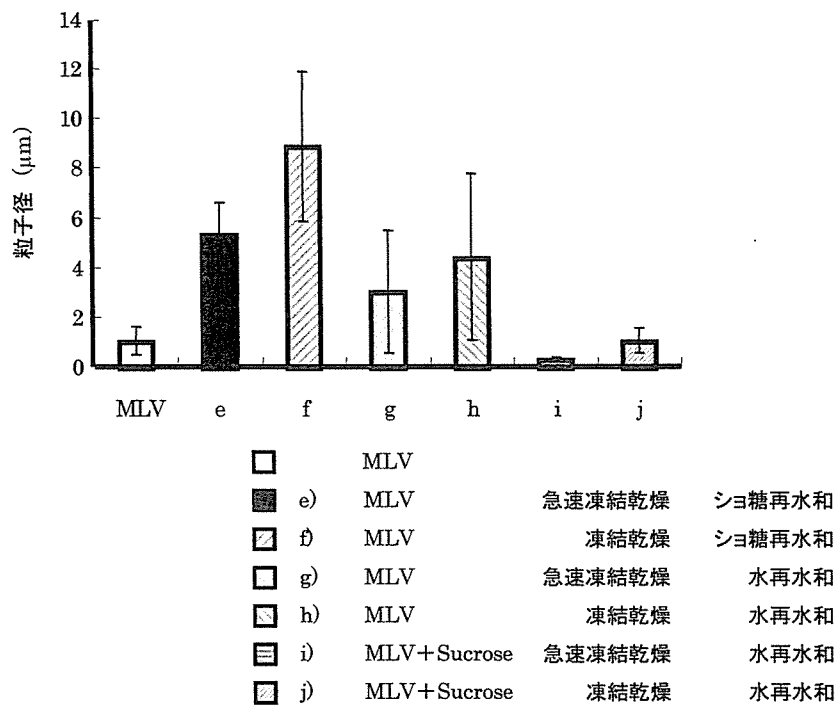


Fig. 1 凍結乾燥と再水和過程におけるショ糖の役割

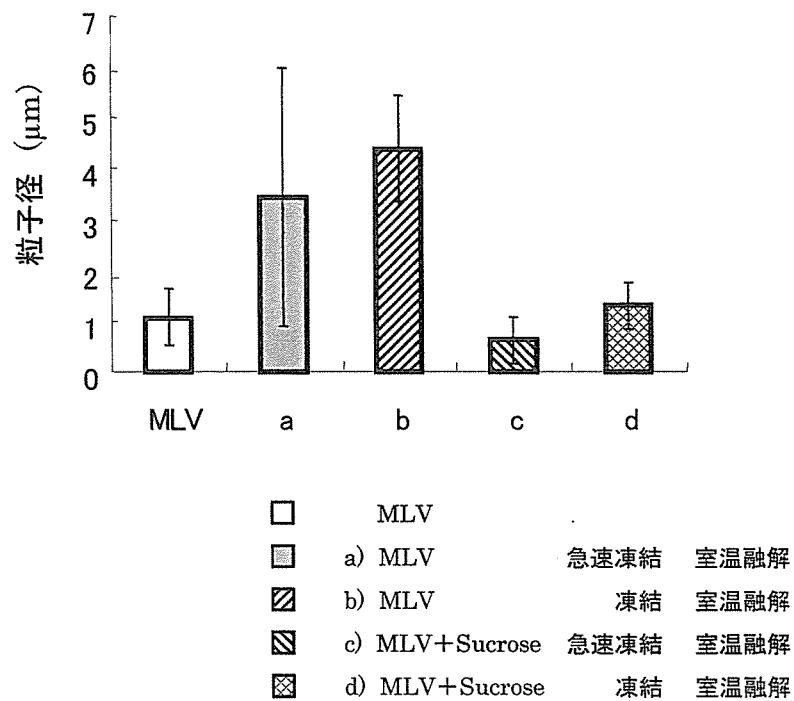


Fig. 2 凍結融解の凍結過程におけるショ糖の役割

Table 1 遺伝子封入リポソーム製剤の組成

DC-Chol : DOPE(モル比)		DNA (μg)	糖	+/-
3:2	B-1	25	Sucrose	16:1
3:2	B-2	25	Isomaltose	16:1
3:2	B-3	25	Isomaltotriose	16:1
1:2	C-1	100	Sucrose	2:1
1:2	C-2	100	Isomaltose	2:1
1:2	C-3	100	Isomaltotriose	2:1
1:2	C-4	12.5	Sucrose	16:1
1:2	C-5	12.5	Isomaltose	16:1
1:2	C-6	12.5	Isomaltotriose	16:1

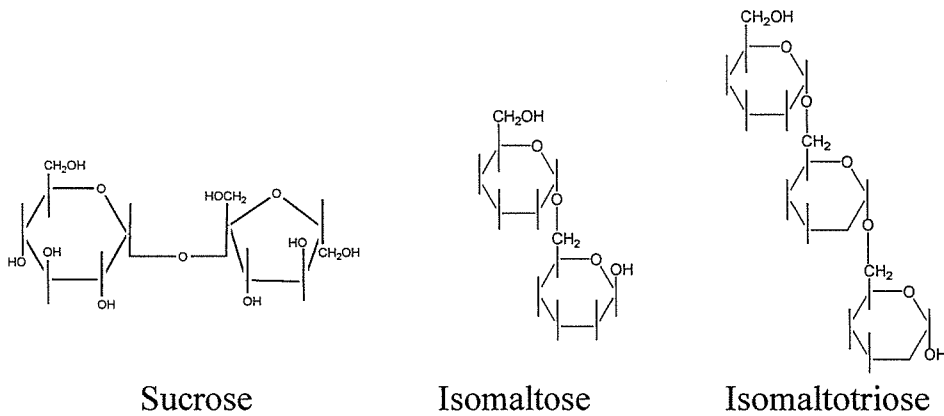


Fig. 3 用いた糖

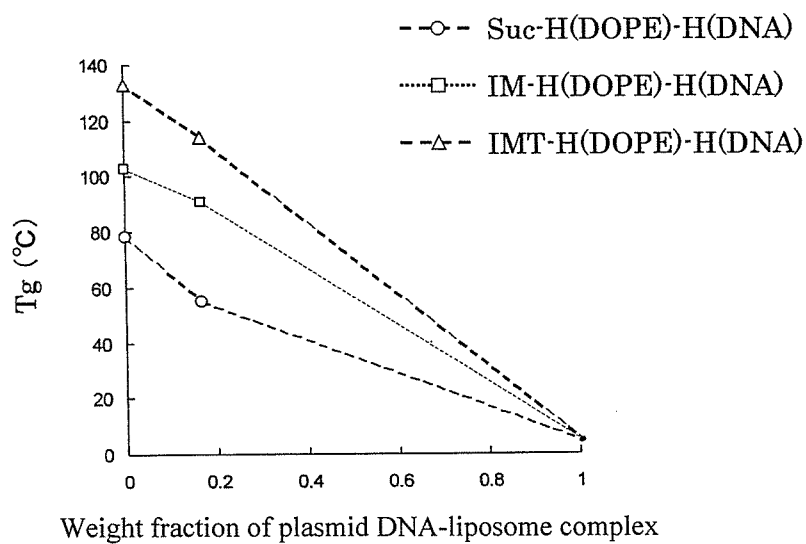


Fig. 4 糖の添加によるプラスミド DNA-リポソーム製剤の Tg 変化

Table 2 遺伝子封入リポソーム製剤の再水和後の粒子サイズ

DC-Chol : DOPE(モル比)		平均サイズ(nm)	分散 (%)	平均サイズ(nm)	分散 (%)
3:2	B-1	179	62	1274	38
3:2	B-2	178	69	1269	31
3:2	B-3	191	70	1558	30
1:2	C-1	448	10	3495	90
1:2	C-2	364	8	3826	92
1:2	C-3	487	11	3161	88
1:2	C-4	238	30	1451	70
1:2	C-5	256	32	1591	68
1:2	C-6	205	32	1130	68

Table 3 再水和後の製剤の溶解性評価

	-20°C	25°C	40°C	50°C
B-1	○	○	○	○
B-2	○	○	○	○
B-3	○	○	○	○
<hr/>				
C-1	△	○	○	○
C-2	△	△	○	○
C-3	△	△	○	△
<hr/>				
C-4	○	○	○	○
C-5	○	○	○	○
C-6	△	△	△	△

分散性	
○	良い
△	粒子が大きい分散

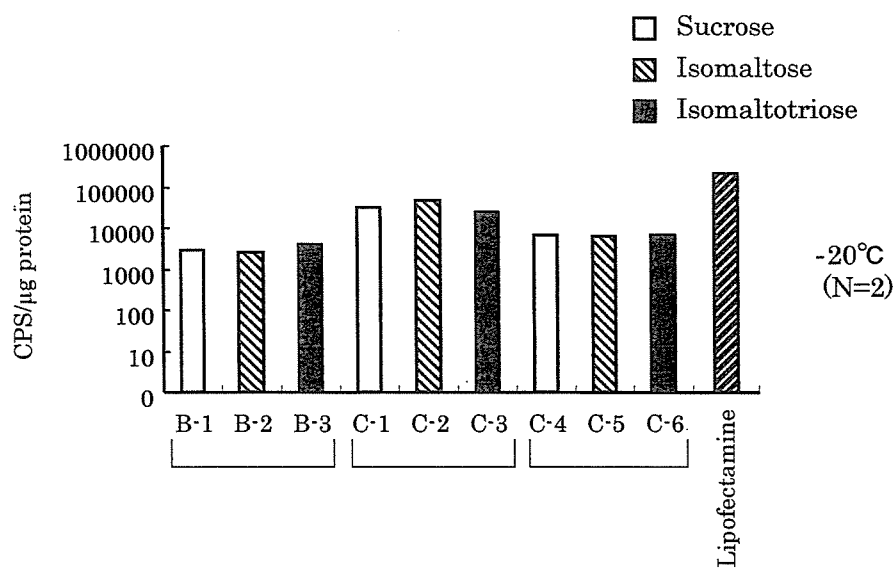


Fig.5 脂質組成比と荷電比の違いによる遺伝子導入効率

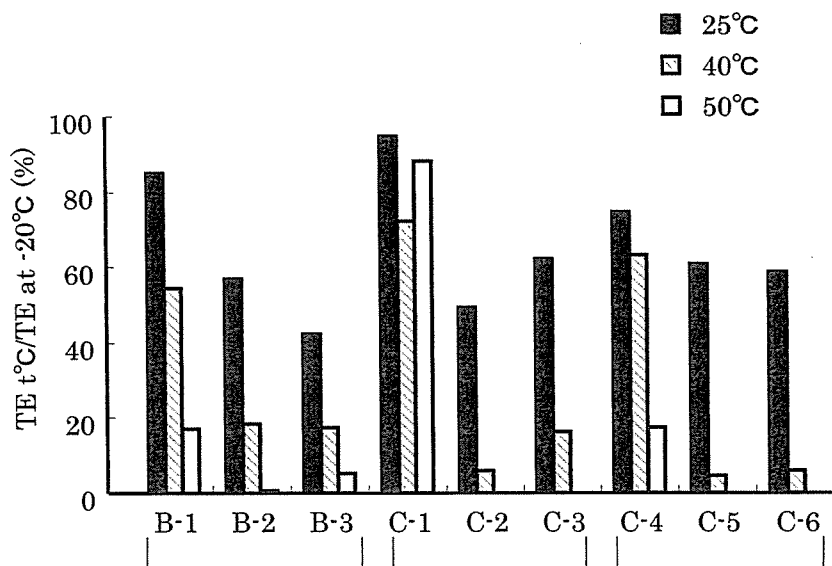


Fig. 6 保存温度によるルシフェラーゼ活性低下率

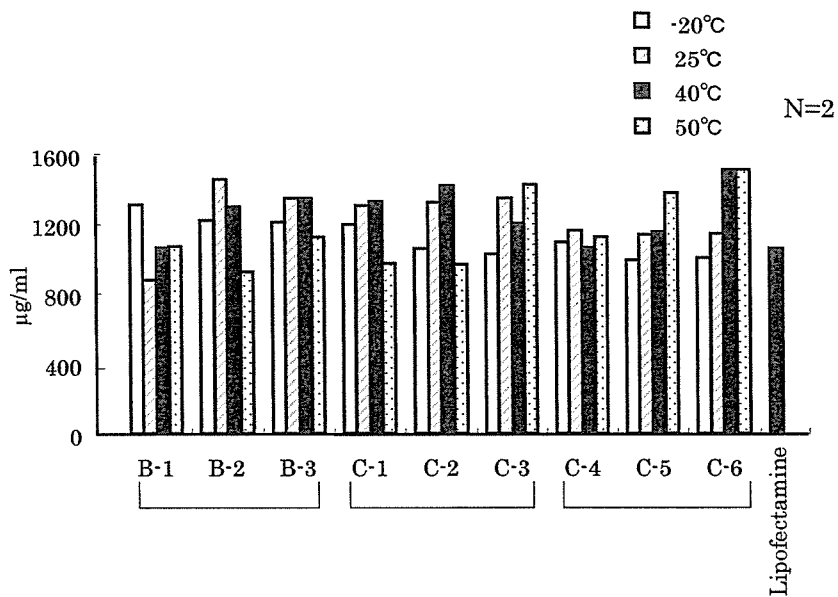


Fig. 7 遺伝子導入リポソーム製剤の細胞毒性

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso, T. Kawanishi,	Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelatd to the glass transition temperature.	<i>Int. J. Pharm.</i>	(2006)	Accepted.	
2) S.Yoshioka, Y.Aso,	Correlations between Molecular Mobility and Chemical Stability during Storage of Amorphous Pharmaceuticals	<i>J. Pharm. Sci.</i> ,	(2006)	Accepted.	
3) S.Yoshioka, T. Miyazaki, Y.Aso,	Degradation Rate of Lyophilized Insulin, Exhibiting an Apparent Arrhenius Behavior around Glass Transition Temperature Regardless of Significant Contribution of Molecular Mobility.	<i>J. Pharm. Sci.</i> ,	(2006)	95, 2684-2691.	
4) S.Yoshioka, T. Miyazaki, Y.Aso.	β -relaxation of insulin molecule in lyophilized formulations containing trehalose or dextran as a determinant of chemical reactivity.	<i>Pharm. Res.</i> ,	(2006)	23, 961-966.	
5) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso,	Physical Stability of amorphous acetanilide derivatives improved by polymer excipients.	<i>Chem. Pharm. Bull.</i> ,	(2006)	54, 1207-1210.	
6) S.Yoshioka, Y.Aso, T. Miyazaki,	Negligible contribution of molecular mobility to the degradation rate of insulin lyophilized with poly(vinylpyrrolidone).	<i>J. Pharm. Sci.</i> ,	(2006)	95, 939-943.	
7) Y. Aso, S. Yoshioka,	Molecular Mobility of Nifedipine-PVP and Phenobarbital-PVP Solid Dispersions as Measured by ^{13}C -NMR Spin-Lattice Relaxation Time.	<i>J.Pharm.Sci.</i> ,	(2006)	95, 318-325.	
8) M. Fukushima, Y. Hattori, T. Yoshizawa, Y. Maitani.	Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice.	<i>International Journal of Oncology</i> ,	30:225-231	(2007).	
9) M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani,	Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of stability in vitro and in vivo,	<i>Int. J. Pharm.</i> ,	308:183-189	(2006).	
10) L. Feng, X. R. Qi, X. J. Zhou, Y. Maitani, S. C. Wang, Y. Jiang, T. Nagai,	Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres,	<i>J Control Release</i> .	112(1):35-42,	(2006).	
11) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani,	Design, synthesis and gene delivery efficiency of novel oligo-arginine linked PEG-lipids: effect of oligo-arginine length.	<i>Int. J. Pharm.</i>	316(1-2): 109-116	(2006).	
12) Y. Hiruta, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Obata, Y. Maitani,	Novel ultra-deformable vesicles entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin,	<i>J Control Release.</i> ,	113: 146-154	(2006).	
13) K. Kawano, M. Watanabe, T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani,	Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles,	<i>J Control Release.</i> ,	112: 329-332	(2006).	
14) T. Yoshitomi, S. Yabuki, H. Kawakami, R. Sato, K. Toma, M. Furuhashi and Y. Maitani,	The structure of artificial lipids possessing oligo(ethylene glycol) and their behavior in water.	<i>Colloids and Surfaces A.</i> ,	284-285: 276-283,	(2006).	
15) S. Igarashi, Y. Hattori and Y. Maitani,	Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic,	<i>J Control Release</i> .	112: 362-368	(2006).	
16) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani,	Intracellular delivery of proteins in complexes with oligoarginine -modified liposomes and the effect of oligoarginine length,	<i>Bioconjugate Chemistry.</i> ,	17: 935-942	(2006).	
17) Y. Hattori and Y. Maitani,	Two-step transcriptional amplification-lipid-based nanoparticles using PSMA or midkine promoter for suicide gene therapy in prostate cancer.	<i>Cancer Science</i> .	97: 787-798	(2006).	
18) K. Hayashi, JB Lee, Y. Maitani, N. Toyooka, H. Nemoto, T. Hayashi,	The role of a HSV thymidine kinase stimulating substance, scopolamine, in improving the efficacy of cancer gene therapy.	<i>J Gene Med</i> .	8(8):1056-67	(2006).	
19) Y. Maitani, S.Yano, Y. Hattori, M. Furuhashi, Y.Hayashi,	Liposome vector containing biosurfactant-complexed DNA as herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery system.	<i>J Liposome Res.</i>	16:359-372	(2006).	

Degradation Rate of Lyophilized Insulin, Exhibiting an Apparent Arrhenius Behavior around Glass Transition Temperature Regardless of Significant Contribution of Molecular Mobility

SUMIE YOSHIOKA, TAMAKI MIYAZAKI, YUKIO ASO

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 3 February 2006; revised 13 April 2006; accepted 10 May 2006

Published online 4 August 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.20689

ABSTRACT: The relative influences of chemical activation energy and molecular mobility in determining chemical reactivity were evaluated for insulin lyophilized with α,β -poly(*N*-hydroxyethyl)-L-aspartamide (PHEA), and compared with that for insulin lyophilized with trehalose, which had been found to have the ability to decrease the molecular mobility of insulin at low humidity. The ratio of the observed rate constant k_{obs} to the chemical activation energy-controlled rate constant k_{act} ($k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$) at glass transition temperature (T_g) was estimated to be approximately 0.6 and 0.8 at 6% RH and 12% RH, respectively, indicating that the degradation rate is significantly affected by molecular mobility at lower humidity conditions. However, these $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ values at T_g were larger than those for the insulin-trehalose system, and changes in the temperature-dependent slope around T_g were less obvious than those for the insulin-trehalose system. Thus, the contribution of molecular mobility to the degradation rate in the insulin-PHEA system appeared to be less intense than that in the insulin-trehalose system. The subtle change in the temperature-dependent slope around T_g observed in the insulin-PHEA system brought about a significant bias in shelf-life estimation when the reaction rate was extrapolated from temperatures above T_g according to the Arrhenius equation.

© 2006 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 95:2684–2691, 2006
Keywords: solid state stability; glass transition; lyophilization; amorphous; shelf life; molecular mobility

INTRODUCTION

It is generally thought that the chemical reactivity of amorphous pharmaceutical formulations is controlled not only by chemical activation energy but also by molecular mobility.^{1,2} An understanding of which factor is the dominant influence on the chemical reactivity of a given system (via quantitative assessment of the relative significance of chemical activation energy and molecular

mobility as a determinant of chemical reaction rate) would provide some practical benefit for stabilization strategy during formulation development. Furthermore, such an assessment would allow us to examine the feasibility of extrapolating the reaction rate obtained under accelerated conditions in order to determine the reaction rate at lower temperatures.

For a chemical reaction that involves a diffusive step for the reactants, as for a bimolecular reaction, a decrease in molecular mobility results in a decrease in reaction rate. The degree of reduction in degradation rate caused by reduced molecular mobility can be evaluated using the indicator $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ (the ratio of the observed rate

Correspondence to: Sumie Yoshioka (Telephone: 81-3-3700-8547; Fax: 81-3-3707-6950; E-mail: yoshioka@nihs.go.jp)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 95, 2684–2691 (2006)
© 2006 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

constant k_{obs} to the chemical activation energy-controlled rate constant k_{act} , the latter being the rate constant in a system in which the reactants have sufficiently high molecular mobility). In previous studies, we determined $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ values for insulin degradation via formation of the cyclic anhydride intermediate in lyophilized formulations containing various excipients, and demonstrated that k_{obs} was dominantly controlled by chemical activation energy and was unaffected by molecular mobility for insulin lyophilized with poly(vinylpyrrolidone)^{3,4} or dextran⁵ under a wide range of conditions of temperature and humidity. In contrast, k_{obs} for insulin lyophilized with trehalose was substantially affected by molecular mobility under conditions of lower humidity³; it was found that β -relaxation of the insulin molecule, as determined by NMR relaxation time, was inhibited by addition of trehalose, resulting in a decrease in the degradation rate.⁵

In this study, the effect of excipients on the relative influences of molecular mobility and chemical activation energy on insulin degradation rate was further examined using insulin lyophilized with α,β -poly(*N*-hydroxyethyl)-L-aspartamide (PHEA), which is expected to inhibit β -relaxation of the insulin molecule through hydrogen-bonding in a manner similar to trehalose. $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$, a parameter representing the degree of reduction in degradation rate caused by reduced molecular mobility, was calculated for the insulin-PHEA system, and assessed for the reliability by simulation studies. In addition, the practical meaning of the estimated $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ was considered in terms of shelf-life estimates which may be biased by ignoring the effect of molecular mobility.

BACKGROUND

Eq. 1 was proposed to calculate the degree of reduction in degradation rate caused by reduced molecular mobility in amorphous solids ($k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$).³

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{act}} \left(\frac{\alpha T \left(\frac{1}{\tau}\right)^{\zeta}}{k_{\text{act}} + \alpha T \left(\frac{1}{\tau}\right)^{\zeta}} \right) \quad (1)$$

Eq. 1 is derived from the Collins and Kimball (CK) equation,^{6,7} which describes k_{obs} for bimolecular reactions as a function of k_{act} and the diffusion-controlled rate represented using the diffusion coefficient. The CK equation was modified by describing the diffusion-controlled rate in terms

of structural relaxation time (τ) instead of the diffusion coefficient, assuming that the diffusion coefficient is inversely correlated to τ . α is a constant that represents the correlation between τ and the diffusion-controlled rate, and ζ is a constant that represents the degree of coupling between τ and the diffusion coefficient.³ τ in Eq. 1 can be calculated from T_g and fragility parameter (m) using the Vogel–Tammann–Fulcher (VTF) and Adam–Gibbs–Vogel (AGV) equations above and below T_g , respectively, as described previously.³ k_{act} in Eq. 1 is described as follows:

$$k_{\text{act}} = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (2)$$

where A , E_a , and R are the frequency factor, activation energy, and gas constant. For a first-order reaction, the time required for 10% degradation (t_{90}) can be calculated from k_{obs} as:

$$t_{90} = -\ln(0.9)/k_{\text{obs}}$$

The previous article briefly described how the contribution of molecular mobility to chemical reactivity is affected by E_a and α ,³ but it was not easily understandable what combination of E_a and α yields a chemical reaction exhibiting a greater contribution of molecular mobility to the reactivity. Therefore, comprehensible figures are presented for a better understanding of the effects of E_a and α on the values of $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$, which were calculated using a model system with T_g of 70°C, m of 50 and A of 1×10^{14} /s.

As shown in Figure 1, $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ and t_{90} at T_g largely depend on E_a and α . When E_a increases beyond the value at which $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ is equal to 0.5 (i.e., k_{obs} is reduced to half of k_{act} due to reduced mobility), $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ gradually approaches unity, indicating a decrease in the effect of molecular mobility and an increase in the effect of E_a . Thus, t_{90} at T_g ($t_{90(T_g)}$) becomes dependent only on E_a , and increases with increasing E_a . In contrast, when E_a decreases below the value at which $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ is equal to 0.5, $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ gradually approaches zero, indicating an increase in the effect of molecular mobility and a decrease in the effect of E_a . Thus, t_{90} becomes independent of E_a , and is controlled only by molecular mobility. The E_a value at which $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ is equal to 0.5 increases with decreasing α .

As shown in Figure 2, when α increases beyond the value at which $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ is equal to 0.5, $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ gradually approaches unity, indicating a decrease in the effect of molecular mobility. Thus, $t_{90(T_g)}$ becomes independent of α , and is controlled only by

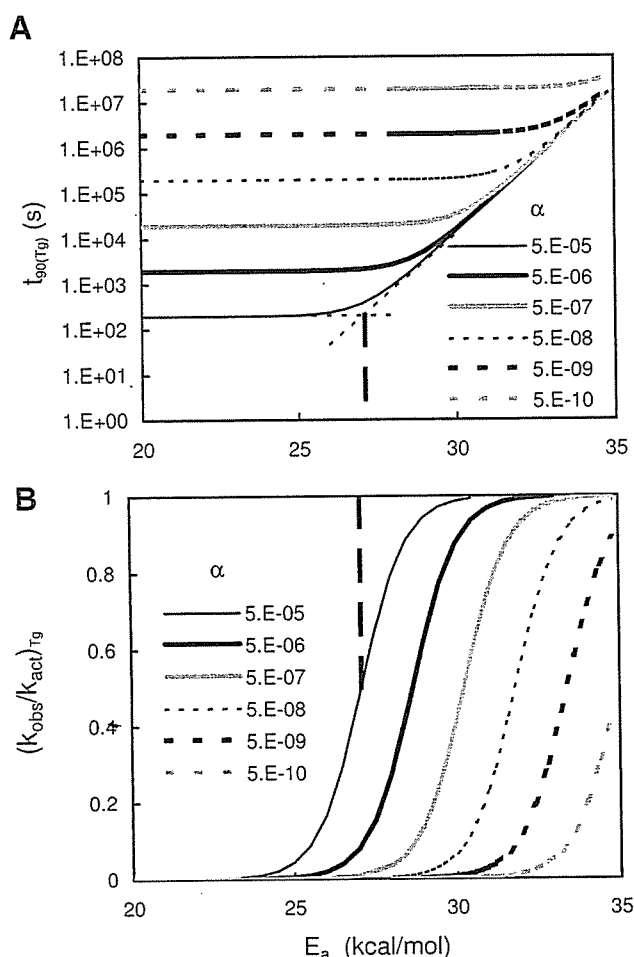


Figure 1. Effect of E_a on the values of t_{90} at T_g (A) and k_{obs}/k_{act} at T_g (B). T_g : 70°C; m :50; A : 1×10^{14} /s.

E_a . In contrast, when α decreases below the value at which k_{obs}/k_{act} is equal to 0.5, k_{obs}/k_{act} gradually approaches zero, indicating an increase in the effect of molecular mobility. Thus, $t_{90(T_g)}$ becomes independent of E_a , and increases with decreasing α . The α value at which k_{obs}/k_{act} is equal to 0.5 increases with decreasing E_a .

Some equations for describing the relationship between molecular mobility and chemical reactivity in amorphous solids have been described in the literature. Pikal¹ presented Eq. 3 to describe the temperature dependence of the degradation rate constant for a diffusion-controlled reaction, using a coupling constant (g), the strength parameter for structural relaxation (D), and the temperature at which the configurational entropy is zero (T_0):

$$k = A_k \exp\left(-\frac{gDT_0}{T - (T/T_f)T_0}\right) \quad (3)$$

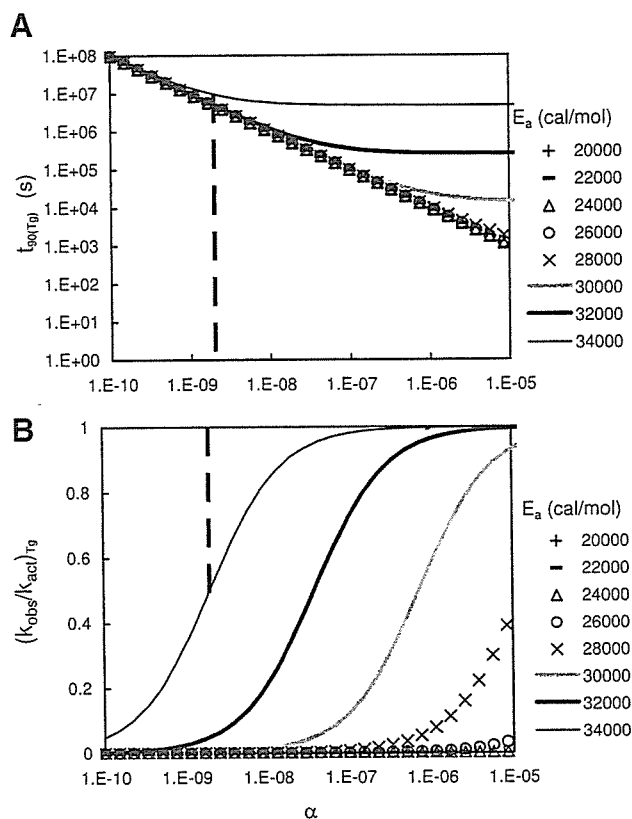


Figure 2. Effect of α on the values of t_{90} at T_g (A) and k_{obs}/k_{act} at T_g (B). T_g : 70°C; m :50; A : 1×10^{14} /s.

where A_k is a pre-exponential constant that depends on the details of the degradation mechanism. A_k would be expected to decrease as the number of diffusional jumps needed to complete a reaction increases. Eq. 3 may be written in the form $k = A_k(\tau_0/\tau)^g$ using a value for structural relaxation time (τ). On the other hand, Eq. 1 may be written in the form $k_{obs} = \alpha T/\tau^\zeta$ when the reaction is diffusion-controlled such that the rate is independent of E_a . Therefore, the terms αT and ζ in Eq. 1 correspond to $A_k\tau_0^g$ and g , respectively, in Eq. 3. Therefore, a decrease in α , a parameter representing the degree of inverse correlation between τ and the diffusion-controlled rate, may correspond to an increase in the number of jumps required for the reaction to proceed, leading to a greater degree of reduction in degradation rate due to reduced molecular mobility.

Craig et al.⁷ presented Eq. 4 to describe the relationship between degradation rate and viscosity (η) for diffusion-controlled bimolecular reaction:

$$k = 8RT/3\eta \quad (4)$$

where R is the gas constant. Eq. 4 may be written in the form $k = 8RT_g\tau_{T_g}/3\eta_{T_g}\tau$, using values of τ_{T_g} and η_{T_g} (τ and η at T_g , respectively) as well as τ . Therefore, the term α in Eq. 1 corresponds to $8R\tau_{T_g}/3\eta_{T_g}$.

EXPERIMENTAL

Materials

Human zinc insulin was purchased from Eli Lilly & Co (Humulin® RU-100). PHEA was prepared via polysuccinimide by polycondensation of aspartic acid as reported.⁹

Lyophilization of Insulin

Lyophilization was carried out in a similar manner as reported previously.³ Human zinc insulin was converted into the zinc-free neutral form by dialysis. PHEA was added to the solution to make a 5 mg/mL of PHEA solution and pH was adjusted to 4.0. The ratio of insulin to PHEA was 1:1.5 w/w. Four hundred microliters of the solution were frozen in a polypropylene sample tube (10 mm diameter), and then dried at a vacuum level below 5 Pa for 23.5 h in a lyophilizer (Freezevac C-1, Tozai Tsusho Co., Tokyo, Japan). The shelf temperature was between -35 and -30°C for the first 1 h, 20°C for the subsequent 19 h, and 30°C for the last 3.5 h.

Lyophilized samples were stored at 15°C for 24 h in a desiccator with a saturated solution of LiBr \cdot H_2O (6% relative humidity (RH)), LiCl (12% RH), potassium acetate (23% RH), $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (43% RH), or NaBr $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60% RH) to obtain samples with various T_g values.

Determination of T_g by Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Modulated temperature DSC experiments were performed using a commercial system (2920; TA Instruments, Newcastle, DE, USA) attached to a refrigerated cooling accessory. The conditions were as follows: modulation period of 100 s, a modulation amplitude of $\pm 0.5^\circ\text{C}$, and an underlying heating rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Samples were put in a hermetic pan. Temperature calibration was performed using indium. The samples, pre-equilibrated at 6% RH, 12% RH, 23% RH, 43% RH, and 60% RH, exhibited a T_g value of 70°C , 60°C , 36°C , 17°C , and -17°C , respectively.

Measurement of Insulin Degradation

Lyophilized samples with various T_g values in tubes with a tight screw-cap were stored at a constant temperature (40 – 95°C), removed at various times, and stored in liquid nitrogen until assayed. Samples were dissolved in 1.5 mL of 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 2.2, adjusted with concentrated H_2SO_4) and each 20 μL aliquot of the solution (insulin concentration was 0.9 mg/mL) was subjected to reverse phase HPLC, as reported previously.³ The column used was Inertsil WP-300 (C8, 4.6 mm \times 250 mm, GL Science, Inc., Tokyo, Japan) maintained at 35°C . Elutions were performed using a mixture of 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 2.2) and acetonitrile solution of 0.07% (v/v) trifluoroacetic acid (72.5:27.5) for 1 min. The ratio of the acetonitrile solution increased linearly from 27.5% to 30% in 15 min, 30% to 35% in 22 min. The detection wavelength was 214 nm.

Decreases in intact insulin with storage time was due to the formation of the cyclic anhydride intermediate followed by formation of A21-desamido insulin and insulin dimer, as previously reported for insulin degradation in lyophilized formulations containing trehalose, poly(vinylpyrrolidone), and dextran.^{3–5}

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 3 shows the degradation time courses for insulin lyophilized with PHEA at 6% RH. Similar time courses were obtained at 12% RH, 23% RH, 43% RH, and 60% RH. The initial stage of

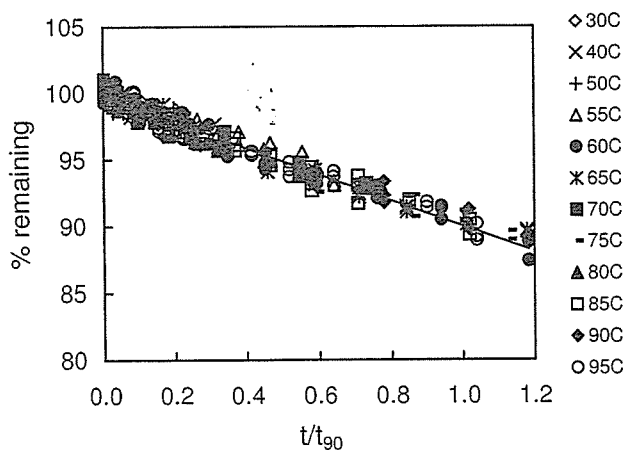


Figure 3. Degradation time courses of insulin lyophilized with PHEA at 6% RH and various temperatures. Solid line represents the theoretical line calculated according to the first-order kinetics.

degradation was describable with first-order kinetics under all the temperature and humidity conditions studied. The solid line in Figure 3 represents the theoretical time course of first-order kinetics.

The obtained k_{obs} was used to calculate t_{90} , and the temperature dependence of t_{90} is shown in Figure 4. Regression analysis according to Eq. 1 was performed assuming that formation of the cyclic anhydride intermediate involves a diffusive step for the reaction site (i.e., molecular mobility required for the intermediate formation is related to diffusion coefficient). The values of A and ζ were assumed to be $10^{14}/\text{s}$ and 0.75, respectively. ζ of 0.75 has been obtained for various organic glasses.¹⁰ The value of τ was calculated according to the VTF and AGV equations above and below T_g , respectively, using T_g values measured by DSC and m of 50 (m value estimated for insulin lyophilized with trehalose in the previous study).³ Lines in Figure 4 represent regression curves for the t_{90} obtained under various humidity conditions. The values of α and E_a were estimated to be $5 \times 10^{-8} \text{ deg}^{-1}$ and 32 kcal/mol, respectively, for degradation at 6% RH. Although the temperature dependence of t_{90} appeared to be linear under all humidity conditions investigated, regression analysis according to Eq. 1 provided $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ values at T_g of approximately 0.6 and 0.8 at 6% RH and 12% RH, respectively, as shown in Figure 5. This finding indicates that the degradation rate is significantly affected by molecular mobility at lower humidity conditions.

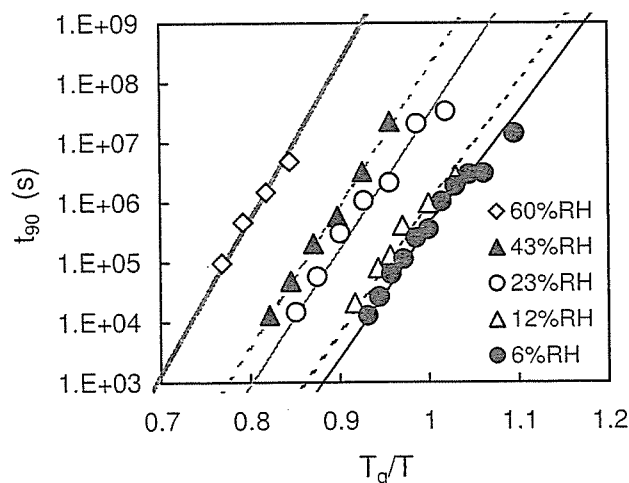


Figure 4. Temperature dependence of t_{90} calculated from apparent first-order rate constant for insulin degradation. Solid lines represent the regression lines obtained according to Eq. 1.

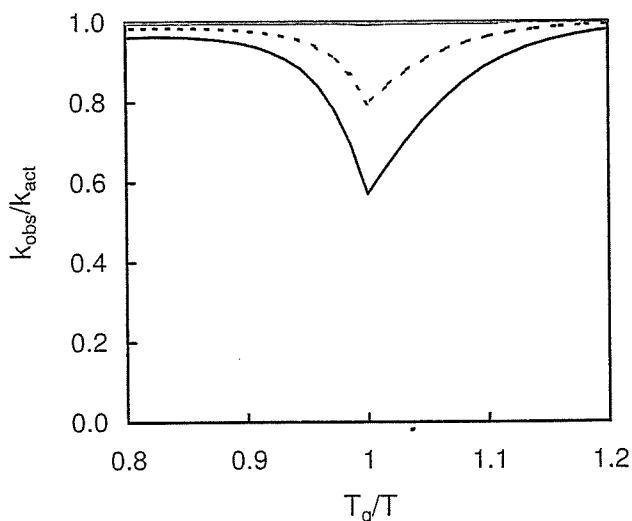


Figure 5. Temperature dependence of $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$, a parameter representing the degree of reduction in degradation rate caused by reduced molecular mobility, obtained at 6% RH (solid line) and 12% RH (dotted line).

As previously reported,³⁻⁵ insulin lyophilized with trehalose exhibited a $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ value at T_g of approximately 0.05, and insulin lyophilized with PVP or dextran exhibited a $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ value at T_g of unity for degradation at 12% RH. Therefore, the effect of molecular mobility on degradation rate in the insulin-PHEA system appeared to be less intense than that in the insulin-trehalose system, but not negligible compared to the insulin-PVP and insulin-dextran systems.

The reliability of the values of α and E_a estimated for insulin degradation at 6% RH in the insulin-PHEA system ($5 \times 10^{-8} \text{ deg}^{-1}$ and 32 kcal/mol, respectively) was examined from changes in the temperature dependence of t_{90} accompanied by changes in α and E_a . Figure 6A shows the effect of changes in E_a on the temperature dependence of t_{90} . The temperature dependence of t_{90} obtained by curve fitting of the observed degradation data to Eq. 1 is represented by the bold solid line (E_a : 32 kcal/mol), along with that of the values of t_{90} derived from k_{act} ($t_{90(\text{act})}$), indicated by symbol +. Although the difference between t_{90} and $t_{90(\text{act})}$ was slight even at T_g , the value of $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ was approximately 0.6 at T_g (Fig. 6B). When E_a increases by 2 kcal/mol (E_a : 34 kcal/mol), the difference between t_{90} (solid line) and $t_{90(\text{act})}$ (circle symbol) becomes unnoticeable, with a $k_{\text{obs}}/k_{\text{act}}$ value greater than 0.9. Conversely, when E_a decreases by 2 kcal/mol (E_a : 30 kcal/mol), the difference between t_{90} (dotted line) and $t_{90(\text{act})}$ (star symbol) becomes substantial, such that t_{90} is