

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の  
確立に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 阿曾 幸男

平成21(2009)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の  
確立に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 阿曾 幸男

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の確立に関する研究 --- 1  
阿曾幸男

II. 分担研究報告

- プラスミドDNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率 ----- 19  
米谷芳枝

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 28

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

## タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の確立に関する研究

主任研究者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

マイクロ熱量計によりβ-ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の分解にともなう微小な発熱を高感度に検出できた。発熱の時間変化のデータに基づいて、製剤の室温における安定性の予測が可能であることを明らかにした。また、タンパク質凍結乾燥製剤の $T_g$ を測定する手法として、TSC測定が有用であることを示した。さらに、遺伝子導入用リポソーム製剤の細胞内取り込み効率はリポソーム/DNA複合体の表面のカチオン性電位および表面の水和状態が関係すると推察され、リポソームの表面水和状態を制御することにより、遺伝子導入効率の高いリポソームベクターの設計が可能であることが示唆された。

### 研究分担者

米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所教授

### 協力研究者

宮崎玉樹 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部主任研究官

### A. 研究目的

近年、熱力学的に不安定なタンパク質や核酸などの高分子医薬品に対し、高度な製剤学的工夫を施すことにより安定化を行い製剤化する試みが多数行われている。不安定な高分子医薬品を医療の場で活用するためには、有効期間の間、その品質が保持されていることが不可欠であり、特に、高度な安定化を行った製剤は、安定性が製剤ロットによって変動する恐れがあり、製剤間の安定性の差を感度良く検出し、安定性試験を行ったロットと同等の安定性を有することを保証する必要がある。近年、我々や米国の研究グループの研究によって、高分子医薬品の安定性と製剤の分子運動性が密接に関連することが明らかになり、製剤の分子運動性に基づいて医薬品の安定性を予測できる可能性が示されつつある。また、保存安定性を支配する分子運動として、構造緩和を引き起こすスケールの大きな運動(分子の並進運動や分子全体の回転運動)に加え、それよりスケールの小さな運動の重要性が指摘されている。

本研究においては、タンパク質や核酸などの高

分子医薬品の製剤化法としてfirst choiceされる凍結乾燥製剤を安定化製剤のモデルとし、固体高分解能NMRや誘電緩和スペクトルなどを用い、分解に必要な分子運動性を高感度に検出すること、および、医薬品の分解にともなうナノワットレベルの極微小な熱を検出することによって、保存安定性と関連する医薬品の物理化学的な特性を明らかにし、安定性を予測する手法の開発を行う。また、遺伝子導入効率が高く、保存安定性に優れた非ウイルス性遺伝子導入製剤の製剤設計を行ない、得られた製剤に本研究で開発された安定性評価法を適用し、その有用性を確認することも目的とする。

本年度は、①マイクロ熱量計によって、β-ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤が発生する熱を測定し、熱の時間変化を解析することにより構造緩和時間を算出し、製剤の運動性を明らかにした。また、緩和の終点における発熱量に基づく製剤の安定性を高感度に評価する方法について検討した。②熱刺激脱分極電流測定装置(Thermally Stimulated depolarizing Current, TSC)により

安定性との関連が示唆されている比較的小さなスケールの運動性を高感度に測定する手法の検討を行った。③非ウイルス性遺伝子導入製剤に関しては、安全性は高いが、遺伝子導入効率が低いのが問題となっている遺伝子導入用リポソームベクターの遺伝子導入効率を改善するために、新規なカチオン性コレステロール誘導体を合成した。これらを用いて調製したリポソームベクターの *in vitro* とマウスの経肺投与における遺伝子導入効率を明らかにし、肺への遺伝子送達用非ウイルスベクターへの有用性を検討した。また、バイオ界面活性剤である mannosylerythritol (MEL:A) や Tween 80 を用い (Fig. 1)、リポソーム表面の改質を行い、遺伝子導入効率と細胞への取り込みに対する影響について検討した。リポソームの表面の水和状態や pH と遺伝子導入効率との関連を明らかにし、遺伝子導入効率の改善のための有用な知見を得た。

## B. 研究方法

### (1) タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度を決める分子運動性とその制御

スクロース、トレハロースあるいはスタキオースを添加剤として用いて、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの凍結乾燥製剤 (タンパク質 : 糖 = 2:1) を調製した。製剤を 12% 相対湿度 (RH) および種々の温度条件に保存した後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの凝集量を HP-SEC で測定した。製剤の発生する熱を等温マイクロ熱量計を用い 20、25、40°C で測定し、また、製剤の  $T_g$  を温度変調 DSC で測定した。

### (2) 熱刺激脱分極電流測定によるタンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性の測定

$\beta$ -ガラクトシダーゼ、BSA、リゾチームなどのタンパク質、スクロース、トレハロース、スタキオース、イソマルトース、イソマルトリオースなどの糖類、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースナトリウムなど高分子医薬品添加剤について、5% 水溶液から凍結乾燥したものを試料として用いた。TS-POLOR 型の装置 (リガク) を用い脱分極電流の測定を行った。分極

は温度 60°C または 80°C、電圧は 10V で行った。100°C から 5°C/min で昇温し、脱分極電流を測定した。

### (3) プラスミド DNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率

#### カチオン性コレステロール誘導体 (CCDs) 合成

4 種類の生体分解性カチオン性コレステロール誘導体 (CCDs) を合成した (Fig. 1)。これらは、塩基性を示すアミノ基が第一、第二、第三級アミノ基かの違いがあり、また、末端の水酸基の有無、コレステロールとの結合がカーバメイト結合かとアミド結合 (OH-Chol) かが異なっている。

#### リポソーム製剤による遺伝子導入実験

各 CCD 脂質と DOPE (モル比で 1:1) からなるリポソームを修正エタノール注入法で調製した。または、MHAPC と DOPE と MEL:A、Tween 80 がモル比で 1:1:0.5 のリポソームを同様に調製した。DNA としては、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA pCMV-luc を用いた。カチオン性リポソームと DNA の (+/-) 荷電比は 3/1、5/1 として水中で複合体 (リポソーム/DNA、リポプレックス) を調製した。これらを A549 細胞、または、マウスの気管に内径 5  $\mu$ m の注射針の注射筒を用いて肺に投与した。遺伝子導入効率は、1 ウエルあたり 2  $\mu$ g DNA となるようにリポプレックスを添加して、24 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。

#### リポプレックスの物性測定

DNA と各リポソームとの相互作用を DNA の円二色性 CD 測定で調べた。リポプレックスの表面の pH は 4-heptadesyl-7-hydroxycoumarin (HC) を添加したリポソームを用いて、Em300-400 nm、Ex450nm、25°C での蛍光を測定して求めた。リポプレックスの表面の水和状態は

6-dodecanoyl-2-demethylaminonaphthalene (laurdan) を添加したリポソームを用いて、25°C で Ex340nm おける Em440 と 490 nm での蛍光強度の差から GP (generalized polarization) 値を求めた。

$$GP(Ex_{340}) = (I_{440} \cdot I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$$

#### (倫理面への配慮)

用いた培養細胞は広く用いられているものであり、倫理面の問題はないと判断した。マウスを用いた実験については、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を行った。

### C. 研究結果

#### (1) ミクロ熱量測定に基づくタンパク質凍結乾燥剤の運動性および安定性評価

スクロース、トレハロースあるいはスタキオースを添加剤として含有するβ-ガラクトシダーゼ凍結乾燥剤の分解速度はFig.2に示すようにスタキオース>トレハロース>スクロースの順に大きくなり、凝集速度は添加剤に大きく依存した。β-ガラクトシダーゼ凍結乾燥剤は保存中に構造緩和およびタンパク質の分解に伴って微小な熱を発生する。Fig.3に40℃および20℃におけるβ-ガラクトシダーゼ凍結乾燥剤の発生する熱の測定例を示す。Fig.3(A)に示すように試料が測定温度と平衡に達するまでの約0.5日間に大きな発熱が観測され、その後、構造緩和に伴い、ゆっくり減衰する発熱が10日間観測される。それ以降の発熱はプラトーとなり、β-ガラクトシダーゼの分解に伴う発熱( $P_k$ )と考えられる。Fig.3(B)は20℃におけるβ-ガラクトシダーゼ凍結乾燥剤の発生する熱の測定例を示す。温度が低下することにより、分解速度が遅くなり、プラトーの発熱は数十nW程度の非常に小さな値となった。観測されたHeat flow(P)の時間変化を1式に従いフィットし、 $\tau_0$ 、 $\tau_1$ 、 $\beta$ および $P_k$ の値を算出した。ここで、 $\Delta Hr(\infty)$ の値は $T_g$ と熱量測定温度Tおよび $T_g$ における比熱変化 $\Delta Cp$ の値を用い、2式に従い算出した。β-ガラクトシダーゼ凍結乾燥剤の $P_k$ の値は添加剤によって異なった。40℃における $1/P_k$ の値と分解速度( $t_{90}$ )を比較すると、Fig.4に示すように、 $1/P_k$ の値はスクロース>トレハロース>スタキオースの順で小さくなり、 $t_{90}$ と同様であった。この結果は $P_k$ がタンパク質凍結乾燥剤の安定性の指標として用いることができることを示す。Fig.5に $P_k$ の温度依存性を示す。20℃から

40℃の温度範囲で観測された $P_k$ と温度の逆数はアレニウスの関係に従い、20℃における $P_k$ の値は40℃における $P_k$ の十分の一の値であった。これらの結果は $P_k$ が分解速度と関連するパラメータであることを示唆するものと考えられる。β-ガラクトシダーゼの分解速度の温度依存性がFig.5に示す $P_k$ の温度依存性と同じ傾きをもつと仮定し、25℃における $t_{90}$ の値を算出したところ、スクロース、トレハロース、スタキオースを添加剤として含有する凍結乾燥剤中でβ-ガラクトシダーゼが10%凝集するのに要する時間は、それぞれ、3.2年、2.4年、1.6年であった。ミクロ熱量測定によってタンパク質凍結乾燥剤の室温における安定性を短期間に評価でき、有用であることが示された。

#### (2) 熱刺激脱分極電流測定によるタンパク質凍結乾燥剤の分子運動性の測定

タンパク質凍結乾燥剤ではさまざまなスケールの分子運動が起きている。昨年の検討により、安定性との関連が注目されているスケールの小さな運動を解析する上でNMR緩和測定が有用であることを明らかにした。 $^{13}C$ -NMRや $^{15}N$ -NMRは製剤中の特定の分子の動きを観測することができ、製剤中のタンパク質の相対的な運動性の差異を明らかにする上で有用である。しかし、NMR緩和時間から絶対的な運動の速度を見積もるためには、広範囲の温度領域における緩和時間の測定が不可欠であり、誘電緩和測定はこのようなNMR緩和測定の弱点を補うものとして有用であると考えられる。本年度は誘電緩和測定の一手法と注目されている熱刺激脱分極電流測定によるタンパク質凍結乾燥剤の分子運動性の測定を検討した。熱刺激脱分極電流測定の最も基本的な測定方法であるGlobal法について概略を記す。温度を高めて試料の分子運動性を高め、試料に電場をかけ、電気双曲子を電場方向に配向させ分極させる。続いて、電場をかけたまま試料を十分に冷却し、分極を凍結させた後、一定速度で昇温する。温度が高くなり、分子運動が始まると、配向した電気双曲子がランダムな方向を向くため、脱分極が起こり、それに伴い $10^{-14}$  A程度の非常に微弱な電流が流れる。Global法のほかに、狭い範囲の温

度で分極させる Thermal window 法などの方法もあり、スケールの異なる分子運動を選択的に検出することが可能である。Fig. 6 にβ-ガラクトシダーゼ凍結乾燥品の熱刺激脱分極電流の測定例を示す。100°C付近に脱分極電流のピークが見られた。BSA やリゾチームにおいても100°C付近にピークが観測された。糖類を含むβ-ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤においても脱分極電流のピークが見られた。Fig. 7 にそのピーク温度を示す。糖類を含むβ-ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤のピーク温度は糖単独の凍結乾燥品のピーク温度とβ-ガラクトシダーゼ単独の試料のピーク温度の中間の値であった。Fig. 8 に糖類の脱分極電流のピーク温度とDSCで測定されるT<sub>g</sub>との関連を示す。T<sub>g</sub>の高い糖ほど脱分極電流のピーク温度が高いことから、脱分極を引き起こす動きはガラス転移(構造緩和)を引き起こす動きと関連していると思われる。乾燥状態のタンパク質はT<sub>g</sub>における比熱変化が小さいためDSCでのT<sub>g</sub>測定が困難であるが、熱刺激脱分極電流測定によってタンパク質のT<sub>g</sub>が測定できる可能性が示唆された。

高分子添加剤の凍結乾燥品についても、タンパク質や糖類の凍結乾燥製剤と同様にガラス転移に関連する運動によって引き起こされる脱分極電流が観測された。メチルセルロース、コポリドンにおいては114°Cに脱分極電流のピークが観測されたが、ヒドロキシプロピルセルロースやカルメロースナトリウム、ヒドロキシエチルスターチにおいては、Fig. 9 に示すようにそれぞれ、25°C、60°C、42°Cにピークが観測された。これらの添加剤はグルコースがつながった高分子にヒドロキシプロピル基、カルボキシメチル基、ヒドロキシエチル基が高分子の側鎖として結合している。分極しやすい水酸基やカルボキシル基が1~2個の炭素結合を介して結合しているため、動きやすく、比較的低温で脱分極電流のピークが観測されたものと考えられる。

### (3) プラスミドDNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率

CCDsからなるリポソームベクターを用いて*in vitro*と、マウスの肺に遺伝子投与後の導入効率

とその化学構造の関連性について検討した。*in vitro*でのDNA導入効率を調べた結果、CCDsのアミノ基の末端に水酸基がない誘導体からなるリポソームが高い発現効率を示した。続いてマウスの経肺投与による遺伝子導入についても検討した結果、*in vitro*と異なり、水酸基をもつ第三級アミン誘導体(MHAPC)が導入に有効であった(Fig. 10)。

次に遺伝子導入効率を改善するために、非イオン性界面活性剤によるリポソームの表面修飾を検討した。MHAPCリポソームにMEL-A、またはTween 80で修飾したベクターにおいて、MEL-Aは*in vitro*と*in vivo*でともに発現を上昇したが、Tween 80はいずれにおいても上昇しなかった(Fig. 10,11)。MEL-Aリポソームベクターは、Tween 80リポソームベクターに比べ、*in vitro*では細胞内に取り込まれた後DNAを早く放出し、*in vivo*ではマウスの肺粘膜上にリポプレックスを長く保持することが確認された。

さらに、MEL-Aのリポソームに対する影響をリポプレックス表面の物理化学的性質に基づいて検討した。これまではリポプレックスの表面電位が細胞との相互作用の指標として用いられてきたが、表面の水和状態やpHについて検討した。HCの解離状態からリポソーム表面のpHを、laurdanのGP値から水和状態を算出した(Fig. 12)。なお、GP値が高いとき、水和されていることを示す。その結果、MEL-Aはリポプレックスの表面電位に影響しないが、Tween 80は有意に低下させることが明らかになった(Fig. 13)。また、Tween 80はMEL-AよりリポプレックスのGP値を減少させたので表面を水和させることも明らかになった(Fig. 14)。なお、このとき各リポソームとDNAの相互作用はCD測定からはほぼ変わらず、また、表面のpHには大きな違いはみられなかった(Fig. 15,16)。これらのリポプレックスでは、MEL-Aは細胞内取り込みが変わらず、Tween 80では減少させた(Fig. 17)。

## D. 考察

### (1) ミクロ熱量測定に基づくタンパク質凍結乾燥

### 製剤の運動性および安定性評価

スクロース、トレハロース、スタキオースを添加した $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の安定性はスクロース>トレハロース>スタキオースの順であり、添加剤の影響を受けた。これらの凍結乾燥製剤について、40~20°Cにおいてマイクロ熱量計によって測定した分解熱( $P_k$ )は、安定性の良いスクロース製剤が最も小さく、スクロース<トレハロース<スタキオースの順であり、添加剤の違いによる安定性の差と関連した。また、 $P_k$ の温度依存性と分解速度の温度依存性が同じであると仮定し、25°Cにおける $\beta$ -ガラクトシダーゼの残存率が90%になる時間を計算することができた。これらの結果は凍結乾燥製剤の安定性予測法として、マイクロ熱量測定が有用であることを示すものであるが、さらに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ以外のタンパク質製剤についても検討を行い、その普遍性を明らかにする必要があると考える。

### (2) 熱刺激脱分極電流測定によるタンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性の測定

$\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤は60~80付近に脱分極電流のピークが観測された。ガラス転移温度が高い試料ほどピーク温度が高いことから、脱分極電流として観測される双曲線の運動は、ガラス転移を起こす動きと関連すると考えられる。DSCでは測定が難しいタンパク質の $T_g$ 測定に有用であることが示された。今後、Global法に加え、Thermal window法による検討を行い、脱分極を引き起こす運動の実態を明らかにするとともに、安定性との関連が注目されるスケールの小さな運動を検出できる測定条件を明らかにする必要があると考えられる。

### (3) プラスミドDNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率

遺伝子導入用リポソームベクターでは、カチオン性脂質が用いられている。これはアニオン性のDNAと複合体リポプレックスを作り、なおかつアニオン性電荷をもつ細胞との相互作用をさせ

るために、カチオン性リポソームとDNAの(+/-)荷電比を調整してカチオン性になるようにしている。従って、このカチオン性脂質の設計は遺伝子導入の鍵となる。また、リポプレックスになったとき、DNAとリポソーム脂質膜との強い分子的相互作用により、サイズや表面状態が変化することが知られている。そのため、これまではリポプレックスの表面状態は表面電位の測定で評価されてきたが、ここでは新たに表面の水和状態とpHが細胞取り込みや遺伝子導入効率の指標にならないかを検討した。

まず、新規カチオン性脂質としては、生体分解性が高く、DNAと適度に相互作用をする脂質として、4種類の生体分解性コレステロール誘導体(CCDs)を合成した。これらは第一から三級のアミノ基、末端の水酸基の有無、コレステロールとの結合がカーバメイトとアミド結合(OH-Chol)と異なっている。

in vitro と in vivo での遺伝子導入に有効な CCD は異なり、in vivo では水酸基をもつ第三級アミンをもつ MHAPC が導入に有効であったことから、肺粘膜上では第三級アミンによるプラスミド DNA との強い結合が DNA の安定性に必要と考えられた。

リポソームの表面状態の遺伝子導入効率と細胞への取り込みに対する影響について検討した。リポソーム表面の改質に用いた MEL-A は in vitro と in vivo でともに発現を上昇したが、Tween 80 はいずれにおいても上昇しなかった。リポプレックスの表面電位においては、MEL-A は変化しないが Tween 80 は有意に低下させ、また、リポプレックスの表面の水和状態においては、Tween 80 は MEL-A より水和させることが明らかになった。したがって、リポプレックスの高いカチオン性の表面電位と水和状態が、細胞内取り込みに関係すると推察された。さらに、MEL-A リポソームベクターは、Tween 80 リポソームベクターに比べ、in vitro では細胞に取り込まれた後 DNA を早く放出したことより、MEL-A は

Tween 80 リポソームベクターと異なる細胞取り込み機構を誘導する可能性が示唆された。

#### E. 結論

(1) 等温マイクロ熱量測定は不安定な高分子医薬品製剤の保存安定性を高感度に評価できる有用な手法であることが明らかになった。

(2) TSCはタンパク質凍結乾燥製剤の $T_g$ 測定に有用であることが明らかになった。

(3) 本研究の結果より、遺伝子導入用リポソーム製剤には、リポソーム/DNA複合体の高いカチオン性の表面電位と水和状態が、細胞内取り込みに関係すると推察された。今後のリポソームベクターの遺伝子導入効率を予測するうえでの1つのマーカーとして、リポソームの表面水和状態を使用できる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.: Feasibility of  $^{19}\text{F}$ -NMR for assessing the molecular mobility of flufenamic acid in solid dispersions. *Chem. Pharm. Bull.*, (2009) 57, 61-64.
- 2) Yoshioka, S., Aso, Y., Kawanishi, T.: Wide-Ranging Molecular Mobilities of Water in Active Pharmaceutical Ingredient (API) Hydrates as Determined by NMR Relaxation Times. *J Pharm. Sci.*, (2008) 97, 4258-4268.
- 3) H.L. Ma, X.R. Qi, W.X. Ding, Y. Maitani, T. Nagai. Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*. 84A(3):598-606 (2008)
- 4) A. Hayama, T. Yamamoto, M. Yokoyama, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani. Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J Nanosci Nanotechnol.*, 8:3085-3090 (2008)
- 5) N. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Maitani, T. Yamauchi, K. Higashiyama, T. Ohba. p-dodecylaminophenol derived from the synthetic retinoid, fenretinide: Antitumor efficacy in vitro and in vivo against human prostate cancer and mechanism of action. *Int J Cancer*. 122(3):689-98 (2008)
- 6) W. Ding, Y. Hattori, K. Higashiyama, Y. Maitani. Hydroxyethylated cationic cholesterol derivatives in liposome vectors promote gene expression in the lung. *Int. J. Pharm.*, 354(1-2):196-203 (2008)
- 7) M. Furuhashi, R. Danev, K. Nagayama, Y. Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani. Decaarginine-PEG-artificial lipid/DNA complex for gene delivery: nanostructure and transfection efficiency, *J Nanosci Nanotechnol.*, 8 (5), 2308-315 (2008)
- 8) Y. Maitani, Y. Aso, A. Yamada, S. Yoshioka. Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome /DNA complexes with high transfection efficiency, *Int. J. Pharm.*, 356:69-75 (2008)
- 9) K. Niikura, Y. Kobayashi, D. Okutsu, M. Furuya, K. Kawano, Y. Maitani, T. Suzuki, M. Narita. Implication of spinal protein kinase Cgamma isoform in activation of the mouse brain by intrathecal injection of the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate using functional magnetic resonance imaging analysis. *Neurosci Lett.*, 433(1):6-10 (2008)
- 10) H.L. Ma, Y.F. Xu, X.R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *Int J Pharm.* 354(1-2):217-26 (2008)
- 11) Y. Maitani, S. Katayama, K. Kawano, A. Hayama, K. Toma, Artificial Lipids Stabilized Camptothecin Incorporated into Liposomes *Biol. Pharm. Bull.*, 31(5), 990-993, (2008)

- 12) M. Watanabe, K. Kawano, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin, *J. Control. Release*, 127 231-238 (2008)
- 13) T. Fujita, M. Furuhashi, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, High gene delivery in tumor by intratumoral injection of tetraarginine-PEG lipid-coated protamine/DNA, *J. Control. Release*, 129(2)124-127 (2008)
- 14) Y. Ohguchi, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani, Selective delivery of folate-PEG-linked nanoemulsion-loaded aclacinomycin A to KB nasopharyngeal cells and xenograft: Effect of chain length and amount of folate-PEG linker, *J. Drug Targeting*, 16(9), 660-667 (2008)
- 15) A. Yamada, Y. Taniguchi, K. Kawano, T. Honda, Y. Hattori, Y. Maitani, Design of folate-linked liposomal doxorubicin to its antitumor effect in mice, *Clinical Cancer Res*, 14 (24) 8161-8168(2008)
- 16) T. Yoshizawa, Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga and Y. Maitani, Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic siRNA delivery in KB tumor xenografts, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 718-725 (2008)
- 17) Y. Hattori, T. Yoshizawa, K. Koga, Y. Maitani, NaCl induced high cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated synthetic siRNA transfer into prostate carcinoma PC-3 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 31. 2294-2301 (2008)
- 18) T. Fujita, M. Furuhashi, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, Calcium enhanced delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes, *Int J Pharm.* 368, 186-192 (2009)
- 19) W. Ding, T. Izumisawa, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection in vitro and in the mouse lung, *Biol. Pharm. Bull.* 32(2):311-315 (2009)
- 20) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani, Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone, *Molecular Pharmaceutics*, 6(1), 98-104 (2009).
- 21) W. Ding, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Surface properties of lipoplexes modified with MEL-A and Tween 80, *Chem. Pharm. Bull.* 57(2), 138-143 (2009)
- 22) Y. Hattori, L. Shi, W. Ding, K. Koga, K. Kawano, M. Hakoshima, Y. Maitani, Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors, *J. Control. Release*, in press.
- 23) Y. Hattori, K. Koga, T. Izumisawa, M. Yamasaki, R. Narishima, S. Yoshida, T. Fukui, Y. Maitani, The distribution of mRNA expression and protein after hydrodynamic injection of transgene in mice, *Biol. Pharm. Bull.* in press.
- 24) M. Furuhashi, T. Izumisawa, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Decaarginine-PEG-liposome Enhanced Transfection Efficiency and Function of Arginine Length and PEG, *Int J Pharm.* in press.
- 25) Y. Li, X. R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai, PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: in vitro and in vivo characterizations, *Nanotechnology*, in press.

## 2. 学会発表

- 1) 阿曾幸男、太田 鋼、宮崎玉樹、川西 徹:  $\gamma$ 線照射を利用して調製したデキストラナーゼ含有デキストランゲルからのタンパク質の放出制御. 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3).
- 2) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: ニトレンジピンエナンチオマーとキラル高分子からなる非

- 晶質固体分散体を用いた薬物・添加剤間相互作用の評価、日本薬学会第129年会(2009.3).
- 3) 阿曾幸男: 高分子医薬品製剤の保存安定性とNMR緩和、よこはまNMR構造生物学研究会第36回ワークショップ「生体系固体NMRの基礎から応用への展開」(2009.3).
- 4) Miyazaki T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi T.: Different crystallization rates of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with chiral excipients. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2008.11).
- 5) Aso, Y., Miyazaki T., Yoshioka, S., Kawanishi T.: Molecular mobility of flufenamic acid in solid dispersions as determined by  $^{19}\text{F}$ -NMR relaxation time. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2008.11).
- 6) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 川西 徹:  $^{13}\text{C}$  標識ニトレンジピン光学異性体の分子運動性に及ぼす高分子添加剤の影響, 第47回NMR討論会(2008.9).
- 7) 箕輪卓也, 川野久美, 白石貢一, 横山昌幸, 米谷芳枝, Gd封入リポソーム製剤のMRIによる腫瘍集積性の評価、フィジカル・ファーマフォーラム、2008.3.24-25
- 8) 下條裕樹、渡辺和男、箕輪潤一、梅田 勲、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、Layer-by-Layer法を用いた表面修飾リポソーム製剤の放出性評価、フィジカル・ファーマフォーラム、2008.3.24-25
- 9) 萩原彩子、服部喜之、丁武孝、米谷芳枝、正電荷コレステロール誘導体を用いたsiRNA送達用脂質ナノ粒子の開発、日本薬学会 第128年会、2008.3.26-28
- 10) 施力、服部喜之、丁武孝、古賀公子、箱島基貴、川野久美、米谷芳枝、フィチン酸を用いたイリノテカン封入リポソーム製剤の調製と抗腫瘍効果の評価、日本薬学会 第128年会、2008.3.26-28
- 11) 古賀公子、服部喜之、米谷芳枝、悪性内分
- 泌腫瘍におけるRET標的siRNAと抗癌剤の併用治療、日本薬学会 第128年会、2008.3.26-28
- 12) 日置敦子、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、血中滞留性リポソーム製剤のin vitro 放出性、日本薬学会 第128年会、2008.3.26-28
- 13) 小野瀬絵里、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、葉酸修飾リポソームの抗腫瘍効果における脂質膜組成の影響、日本薬学会 第128年会、2008.3.26-28
- 14) 古幡昌彦、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝、オリゴアルギニン PEG 修飾リポソームによる細胞内取り込み経路および遺伝子発現、日本薬学会 第128年会、2008.3.26-28
- 15) 下條裕樹、渡辺和男、箕輪潤一、梅田勲、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、Layer-by-Layer法を用いた表面修飾リポソーム製剤の調製と評価、日本薬学会 第128年会、2008.3.26-28
- 16) 小林昇平、古幡昌彦、R. Danev、永山國昭、戸潤一孔、服部喜之、米谷芳枝、原口徳子、オリゴアルギニン脂質/DNA 複合体の細胞内動態、遺伝子・デリバリー研究会 第8回シンポジウム、2008.5.9
- 17) 古賀公子、服部喜之、福島正義、米谷芳枝、ハイドロダイナミクス法を用いたアディポネクチン遺伝子による糖尿病遺伝子治療、日本薬剤学会 第23年会、2008.5.20-22
- 18) 箕輪卓也、川野久美、白石貢一、横山昌幸、米谷芳枝、Gd封入リポソームのDCE-MRIによる腫瘍血管透過性の評価、第3回日本分子イメージング学会学術大会、2008.5.22-23
- 19) 丁武孝、服部喜之、米谷芳枝、MEL-A modified MHAPC-liposomes for gene delivery in vitro and in the lung、第10回応用薬理シンポジウム、2008.6.7-8
- 20) 谷口幸寛、川野久美、米谷芳枝、葉酸とPEG修飾のデザインによるドキシソルピシン封入リポソーム製剤の抗腫瘍効果の評価、第24回日本DDS学会、2008.6.29-30
- 21) Xian Rong Qi, Yuan Li, Yoshie Maitani, Tsuneji Nagai, PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: in vitro and in vivo characterizations, 第24回日本DDS学会、2008.6.29-30

- 22) 箕輪卓也、川野久美、白石貢一、横山昌幸、米谷芳枝、Gd 封入リポソーム製剤の MRI による腫瘍集積性の評価、第 24 回日本 DDS 学会、2008. 6. 29-30
- 23) 箱島 基貴、服部 喜之、米谷 芳枝、Her-2 発現腫瘍に対する Her-2 標的 siRNA と抗癌剤との併用治療の検討、第 24 回日本 DDS 学会、2008. 6. 29-30
- 24) Y. Hattori and Y. Maitani, Cationic Hydroxyethylated Cholesterol-based Nanoparticle-Mediated Synthetic siRNA Transfer into Prostate Carcinoma PC-3 Cells, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, 2008.7.19-22
- 25) Y. Taniguchi, K. Kawano, Y. Maitani, Targeting effect of folate-linked liposomal doxorubicin was improved by TGF- $\beta$  inhibitor, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, 2008.7.19-22
- 26) K. Koga, Y. Hattori, Y. Maitani, RET-targeted siRNA Inhibits the Growth in Medullary Thyroid Carcinoma TT Cells and the Xenografts, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, 2008.7.19-22
- 27) 丁武孝、泉澤友宏、服部喜之、米谷芳枝、MEL-A and Tween 80 modified cationic liposomes for gene transfection in vitro and in the lung, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, 2008.7.19-22
- 28) Y. Maitani, A. Yamada, Y. Taniguchi, K. Kawano, Y. Hattori, Design of folate linked-liposomal doxorubicin to its antitumor effect in mice, Ehrlich II, 2nd World Conference on Magic Bullets, 2008.10.3-5
- 29) Y. Maitani, Liposomal Drug Delivery : An Update, 22nd Federation of Asian Pharmaceutical Association Congress, 2008. 11.7-10
3. その他  
なし

H. 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



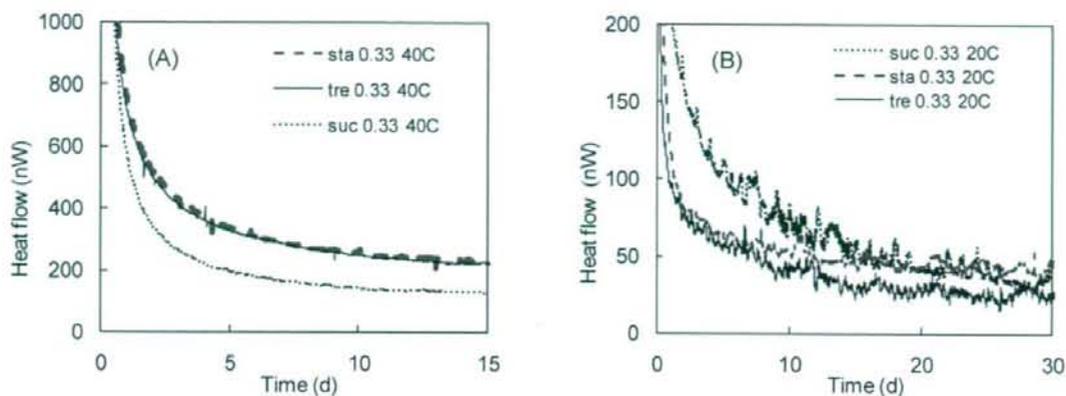


Fig.3. Heat flow curves for lyophilized  $\beta$ -Galactosidase formulations with sugars at 40°C (A) and 20°C (B).  
Sugar fraction:0.33 w/w.

$$P = 177.8 \frac{\Delta H_r(\infty)}{\tau_0} \left(1 + \frac{\beta t}{\tau_1}\right) \left(1 + \frac{t}{\tau_1}\right)^{\beta-2} \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_0}\right) \left(1 + \frac{t}{\tau_1}\right)^{\beta-1}\right] + P_k \quad (1)$$

$$\Delta H_r(\infty) = (T_g - T) \cdot \Delta C_p \quad (2)$$

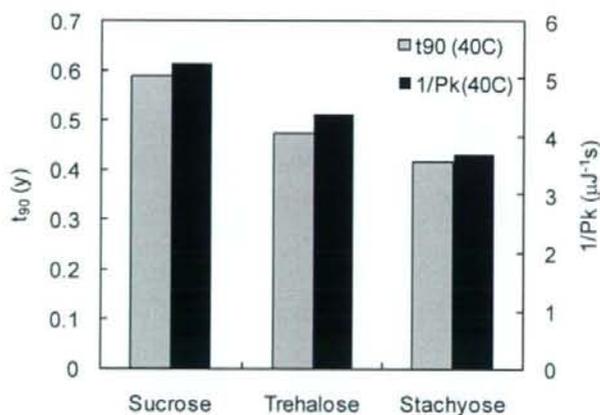


Fig.4. Comparison of  $P_k$  determined by microcalorimetry and aggregation rate ( $t_{90}$ ) for lyophilized  $\beta$ -galactosidase formulations with sugars.  
Sugar fraction: 0.33w/w.

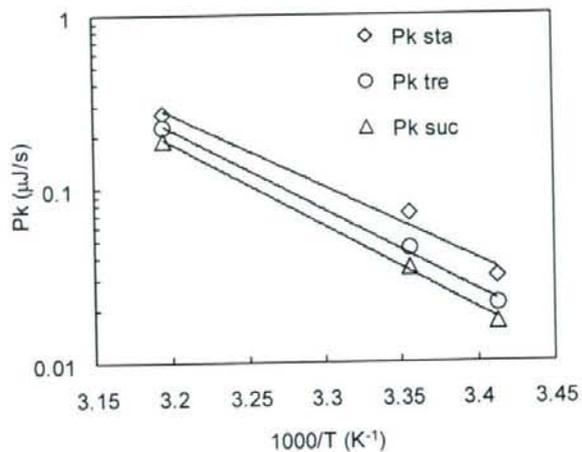


Fig.5. Temperature dependence of  $P_k$  of lyophilized  $\beta$ -galactosidase formulations with sugars.

Sugar fraction: 0.33 w/w

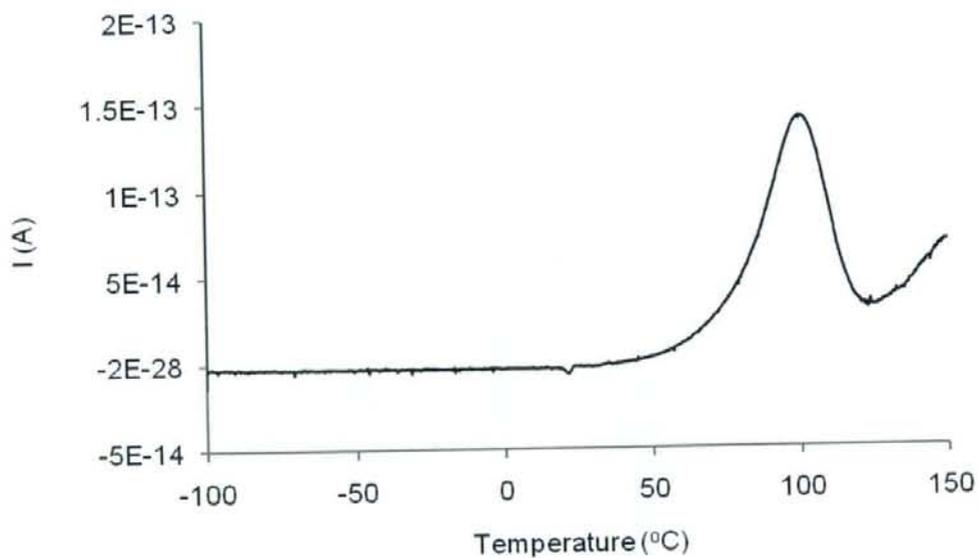


Fig.6. Typical TSC curve for lyophilized  $\beta$ -galactosidase.

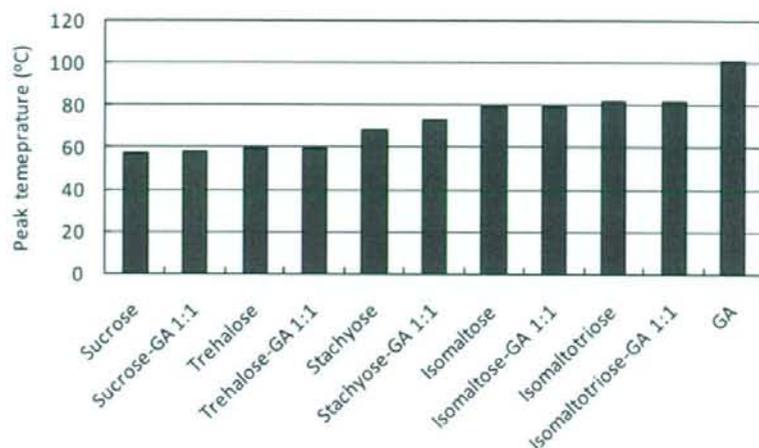


Fig.7. Peak temperature observed for TSC curves for lyophilized sugars and  $\beta$ -galactosidase formulations.

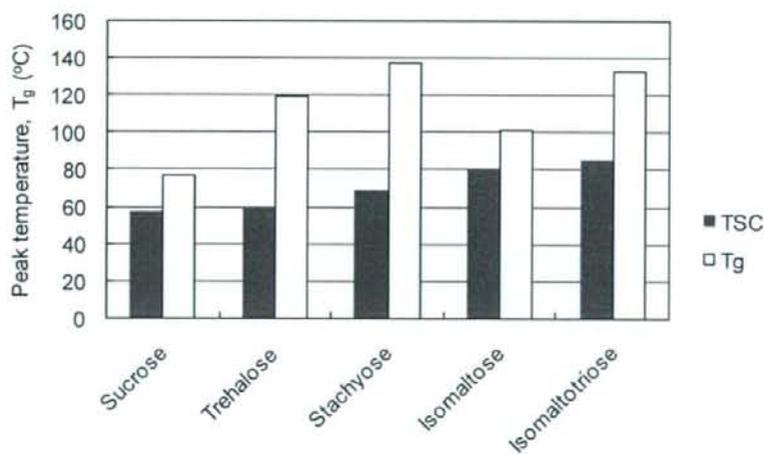


Fig.8. Comparison between  $T_g$  and peak temperature observed for TSC curves for lyophilized sugars.

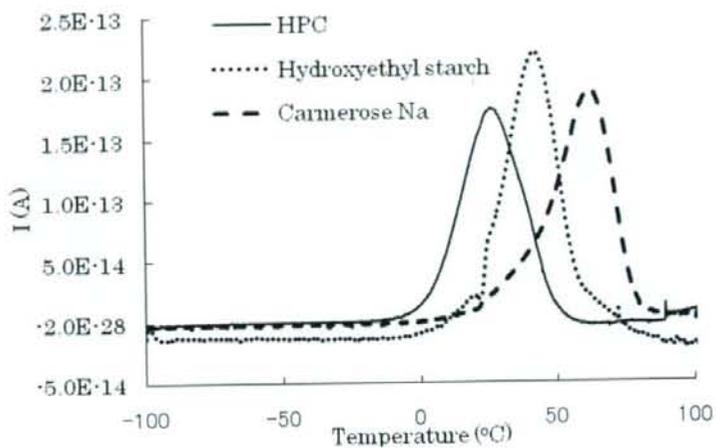


Fig.9. Typical TSC curves for cellulose ether excipients.

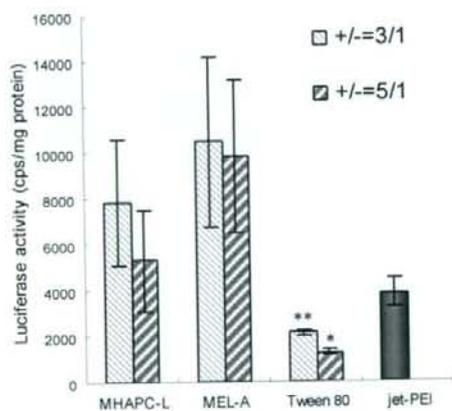


Fig.10. Gene transfections of MHAPC-lipoplexes in the lung at 24 h

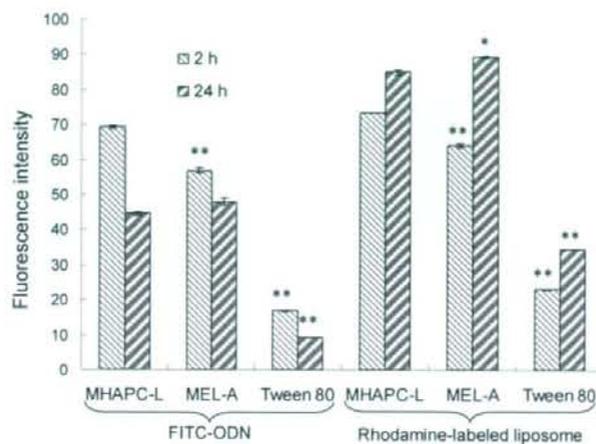


Fig.11. Cellular association of MHAPC-lipoplexes (+/-=3/1) in A549 cells.

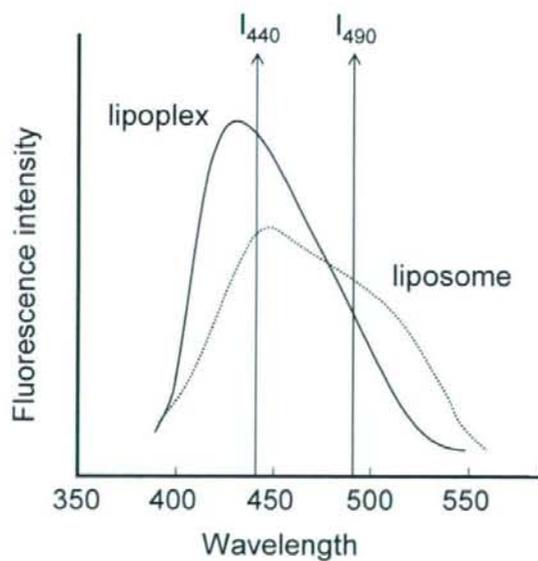


Fig.12. The representative spectrum of laurdan in liposome and lipoplex

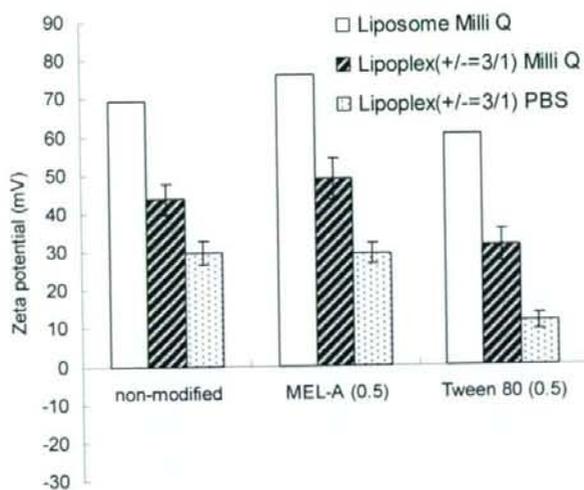


Fig.13.  $\zeta$ -potential of MHAPC-liposome and -lipoplex in Milli Q and PBS.

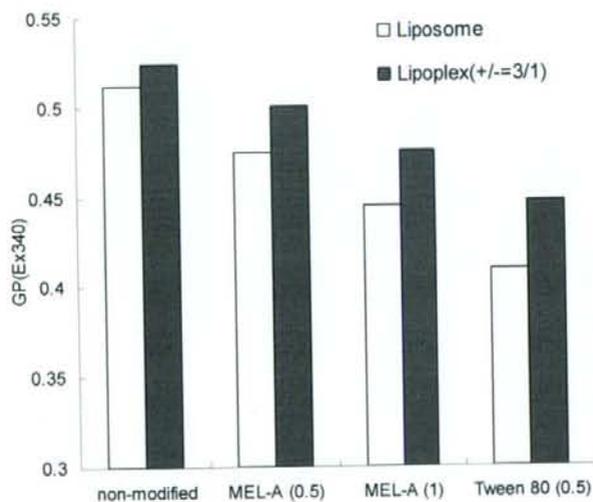


Fig.14. Change of GP values (hydration) of MHAPC-liposome and -lipoplex.

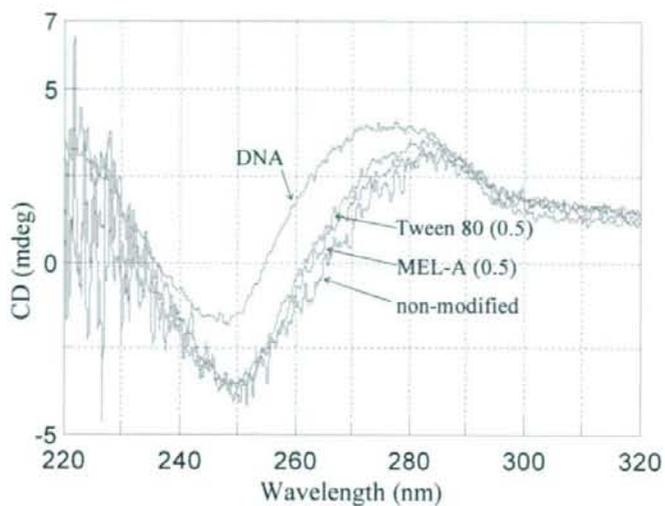


Fig.15. The CD spectrum of DNA in MHAPC-lipoplex..

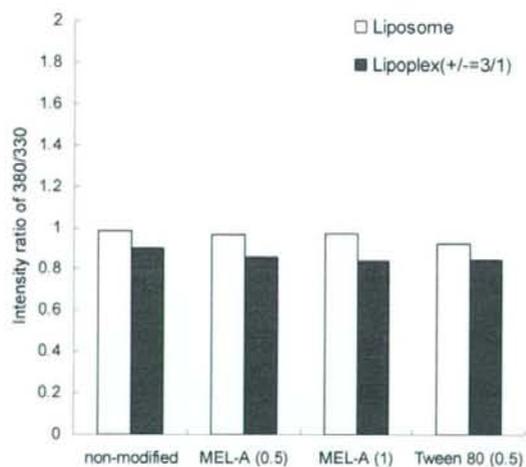


Fig.16. Change of surface pH of MHAPC-liposome and -lipoplex.