



## 薬の名前

# ステムを知れば薬がわかる

Stems used in drug names : For the better understanding of pharmacological actions of drugs

第48回

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

山本美智子

MICHIKO YAMAMOTO

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮田直樹

NAOKI MIYATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

## はじめに

本連載第48回(本誌2010年7月号)では、アダマンタン誘導体を示す「-mantadine/-mantine/-mantone」、ベンゾポルフィリン誘導体を示す「-porfin」、キノリン誘導体を示す「-quine」、代替血液や診断に用いるパーフルオロ化合物を示す「perfl(u)-」、神経保護作用を有する5-HT<sub>1A</sub>受容体作動薬/拮抗薬を示す「-zotan」、合成ヘパリンを示す「-parinux」などのステムを紹介した。

今回は、ニトロ化合物、セルロース誘導体、ヨード含有造影剤、放射性ヨウ素含有医薬品を示すステムを紹介する。

## 「nitro-/nitr-/(-)nit-/(-)ni-」：ニトロ化合物

「nitro-/nitr-/(-)nit-/(-)ni-」は、ニトロ化合物を示すステムである。以下、順に紹介する。

### (1)nitro- :

ニトロ化合物を示すステム「nitro-」を持つ日局収載

医薬品として、狭心症治療薬のNitroglycerin(ニトログリセリン)がある。ニトログリセリンが体内で分解されてできる一酸化窒素はグアニル酸シクラーゼを活性化しcGMPの産生を増やす。その結果、細胞内のCa濃度が低下し、血管平滑筋が弛緩し血管を拡張させる。このほか、JAN品目として、抗菌薬のNitrofurantoin(ニトロフラントイン)がある。ニトロフラントインは、グラム陽性菌および陰性菌に制菌および殺菌的に作用する。国内では動物用医薬品として使用されているが、医薬品としては承認されていない。米国では、尿路感染症の適応で承認されている。また、NitrofurantoinとNitromersolは、それぞれ、抗菌薬と消毒薬として米国薬局方などに収載されている。

INNリストには、テトラサイクリン系抗菌薬Nitrocycline、駆虫薬としてNitrodanやNitroscanateやNitroxinil、抗エストロゲン作用を示すNitromifene、抗菌作用を示すNitroxolineなどが収載されているが、すべて未承認である。なお、ニトロ化合物を示すステム「nitro-」は置換基名と同一であり、あまりに化学的であるため、1979年以降医薬品の一般名には使われていない。

図1にニトロ化合物を示すステム「nitro-」を持つ医薬品の例を示す。



# 薬の名前

## ステムを知れば薬がわかる

Stems used in drug names : For the better understanding of pharmacological actions of drugs

### 最終回

国立医薬品食品衛生研究所

奥田晴宏, 川崎ナナ, 内田恵理子

HARUHIRO OKUDA, NANA KAWASAKI, ERIKO UCHIDA

National Institute of Health Sciences

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

山本美智子

MICHIKO YAMAMOTO

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮田直樹

NAOKI MIYATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

## はじめに

本連載第49回(本誌2010年8月号)では、ニトロ化合物を示すステム「nitro-/nitr-/(-)nit-/(-)ni-」、セルロース誘導体を示すステム「cell-/cel-/cell-ate/-cellose」、ヨード含有造影剤を示すステム「io-」、放射性ヨウ素含有医薬品を示すステム「io(d)-/-io-」を紹介した。

本連載第1回(Pharm Tech Japan, Vol.22, No.9, 1675(2006))で紹介したように、世界保健機関(WHO)の医薬品に関する国際一般名称(INN)委員会は、世界各国から申請された医薬品原薬の国際一般名を定めるとともに、必要に応じて新しいステムを造語し、既存のステムの定義に当てはまらない医薬品に適用している。本連載は、2006年に公表された“The use of stems in the selection of International Nonproprietary Names (INN) for pharmaceutical substances”および

“International Nonproprietary Names(INN) for biological and biotechnological substances”に基づいて医薬品のステムとそのステムを持つ医薬品を紹介してきた。上記の2つのガイドブックは、新しい版<sup>1,2)</sup>が2009年に公開されており、本連載の最終回はこれらに紹介されている新しいステムを紹介する。

## 「-ciguat」：グアニル酸シクラーゼ賦活化薬・刺激薬

「-ciguat」は、グアニル酸シクラーゼ賦活化薬・刺激薬を示すステムである。グアニル酸シクラーゼは、GTPから細胞内セカンドメッセンジャーであるcGMPを産生する酵素であり、細胞膜1回貫通型の心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体と細胞質に存在する可溶性酵素の2種が存在する。血管内皮細胞に存在する可溶性酵素はcGMPの生成とそれに引き続くcGMP依存性のプロテ

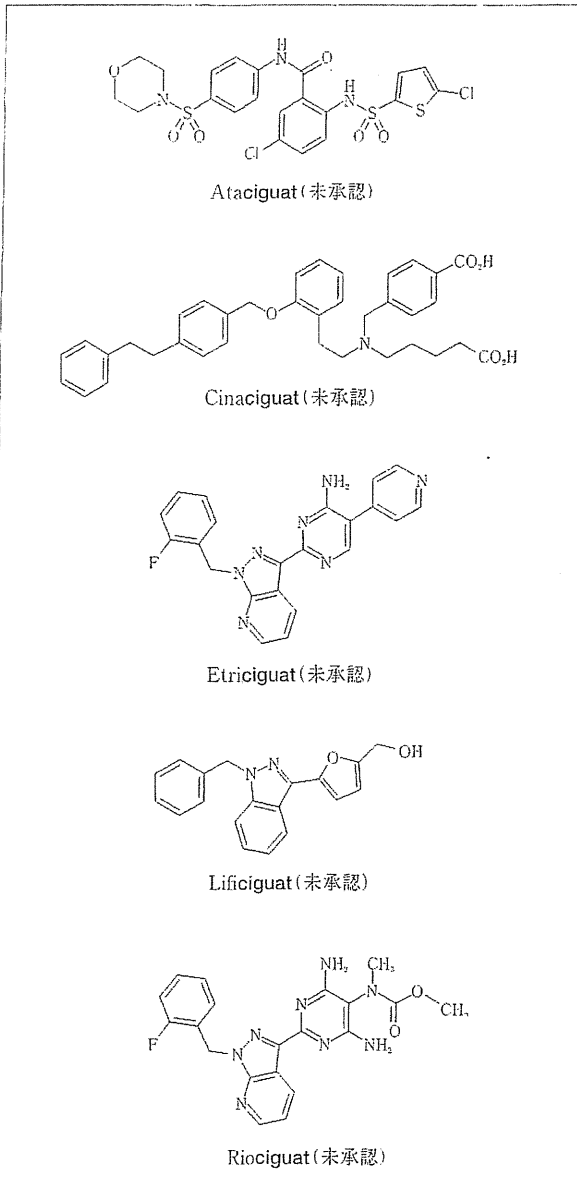


図1 グアニル酸シクラーゼ賦活化薬・刺激薬を示すステム「-ciguat」を持つ医薬品

インキナーゼの活性化を介して血管の緊張を調節している。

JAN品目の中には本ステムを持つ医薬品はない。INNリストには、Ataciguat, Cinaciguat, Etraciguat, Lificiguat, Riociguatが収載されているが、これらは可溶性グアニル酸シクラーゼの賦活化薬・刺激薬である。

Cinaciguatは、国内外で急性非代償性心不全を呈する慢性うっ血性心不全を適応として開発中である。Riociguatは国内および欧米(共同治験)において、左心

不全に伴う肺高血圧症、肺動脈性肺高血圧症および慢性血栓塞栓性肺高血圧症を適応として開発が進められている。Ataciguat, Etraciguat, Lificiguatは、いずれも承認に至っていない。

図1にグアニル酸シクラーゼ賦活化薬・刺激薬を示すステム「-ciguat」を持つ医薬品の例を示す。

## 「-gliptin」：ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) 阻害薬

「-gliptin」は、DPP(dipeptidyl peptidase)-4の阻害作用を有する血糖降下薬であり、本連載第23回で紹介した血糖降下薬を示すステム「-gli-」(Pharm Tech Japan, Vol.24, No.7, 1267(2008)参照)のサブステムの1つである。DPP-4についてもステム「-gli-」で説明した。

JANには、Alogliptin(アログリプチン)の安息香酸塩、Sitagliptin(シタグリプチン)のリン酸塩水和物、Vildagliptin(ビルダグリプチン)が収載されている。日本では、2009年にシタグリプチンリン酸塩水和物が、また2010年にアログリプチン安息香酸塩が、2型糖尿病の効能で承認されている。ビルダグリプチンはわが国では未承認であるが、欧州では使用されている。

INNリストには、Carmegliptin, Dutogliptin, Linagliptin, Saxagliptin, Tenueligliptin等が収載され、このうちSaxagliptinは米国において2型糖尿病治療に用いられている。Carmegliptin, Dutogliptin, Linagliptin, Tenueligliptin等は、開発が進んでいるが承認に至っていない。

図2にジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) 阻害薬を示すステム「-gliptin」を持つ医薬品の例を示す。

## 「-mapimod」：分裂促進因子活性化タンパク質(MAP)キナーゼ阻害薬

「-mapimod」は、分裂促進因子活性化タンパク質(MAP)キナーゼ阻害薬を示すステムであり、本連載第44回で紹介した免疫調節薬を示すステム「-imod」(Pharm Tech Japan, Vol.26, No.3, 430(2010)参照)のサブステムの1つである。MAPキナーゼは、シグナル伝達に参与するタンパク質リン酸化酵素であり、セリン/トレオニンキナーゼに分類される。全身の細胞に発現し、細胞増殖制御や炎症反応に関わるさまざまな活動

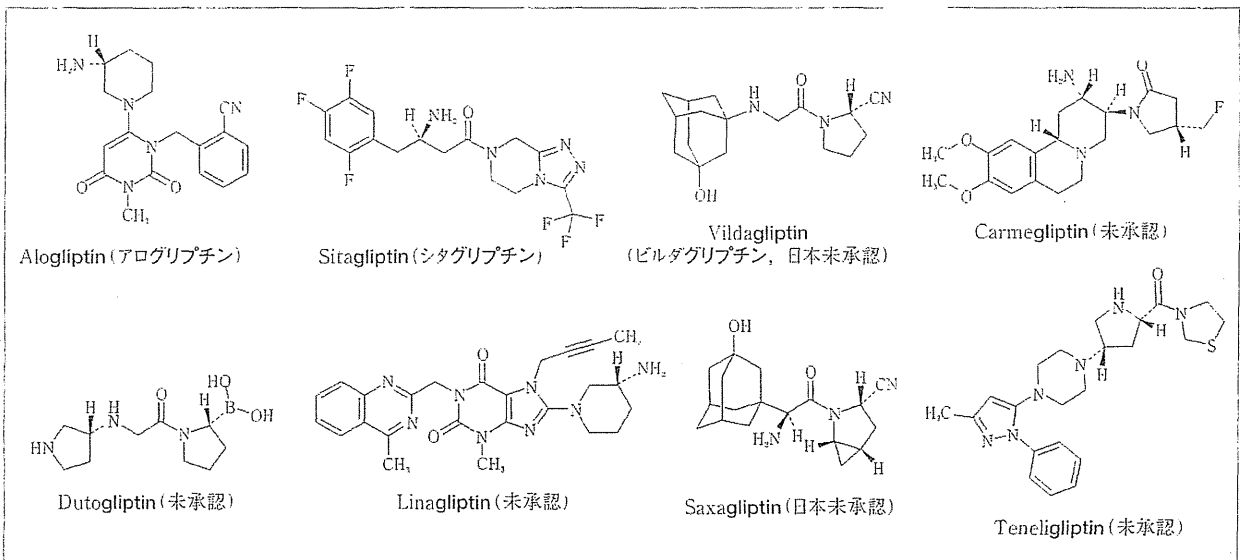


図2 ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4)阻害薬を示すステム「-gliptin」を持つ医薬品

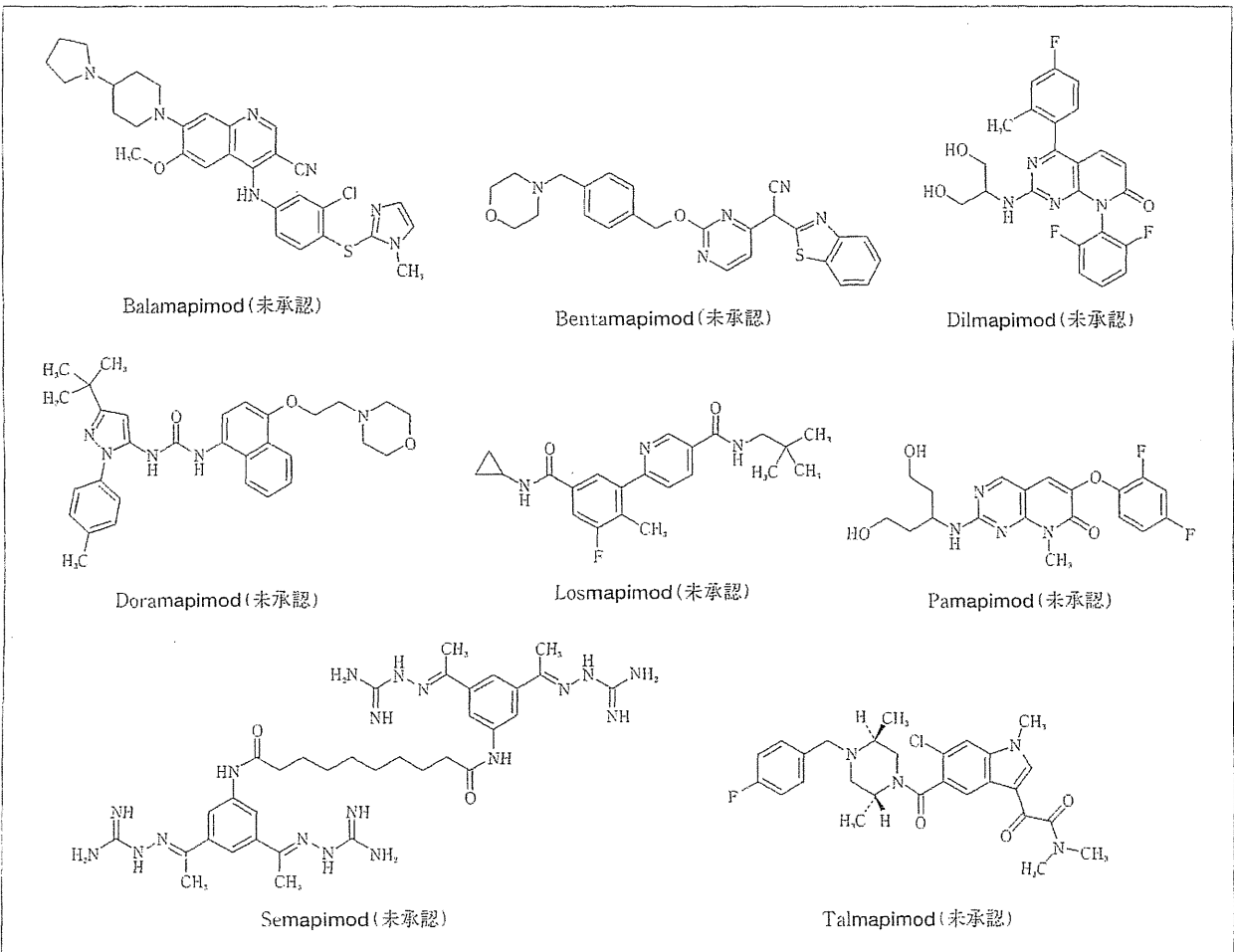


図3 分裂促進因子活性化タンパク質(MAP)キナーゼ阻害薬を示すステム「-mapimod」を持つ医薬品

を調節している。

INNリストには、Balamapimod, Bentamapimod,

Dilmapimod, Doramapimod, Losmapimod, Pamapimod, Semapimod, Talmapimodが収載されて

STEMを知られば薬がわかる

いる。炎症性疾患治療薬として期待され、Dilmapimodは慢性閉塞性肺疾患、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症および神経障害性疼痛を適応として、Losmapimodは関節リウマチ、慢性閉塞性肺疾患、アテローム性動脈硬化症、大うつ病、神経障害性疼痛および急性冠症候群等を適応として、Semapimodはクローン病、関節リウマチおよび乾癬などを適応として開発されているが、これらを含め承認されている医薬品はない。

図3に分裂促進因子活性化タンパク質(MAP)キナーゼ阻害薬を示すステム「-mapimod」を持つ医薬品の例を示す。

「-rolimus」：  
免疫抑制薬，ラパマイシン誘導体

「-rolimus」は、免疫抑制薬であるラパマイシン誘導体を示すステムであり、本連載第44回で紹介した免疫抑制薬を示すステム「-imus」(Pharm Tech Japan, Vol.26, No.3, 431(2010)参照)のサブステムの1つである。

ラパマイシン(Rapamycin)は放線菌*Streptomyces hygroscopicus*が産生する免疫抑制効果を有するマクロライド抗生物質であり、そのINNはSirolimus(シロリムス)である。日本では未承認であるが、海外では免疫抑制薬として使用されている。

「-rolimus」を語尾に持つ多数の医薬品が免疫抑制薬を示すステム「-imus」の中に収載されていたが、今回正式にサブステム「-rolimus」としてステムリストに収載された。

サブステム「-rolimus」を持つ医薬品としては、Everolimus(エベロリムス)、Pimecrolimus, Sirolimus, Tacrolimus(タクロリムス), Temsirolimus(テムシロリムス), Zotarolimusなどがあるが、これらについてはすでに上述したステム「-imus」で紹介済みである。

「-mulin」：  
プレウロムリン系抗生物質

「-mulin」は、プレウロムリン系抗生物質を示すステムである。Pleuromulin(Pleuromutilin)は、*Clitopilus passeckerianus*が産生するシクロペンタアヌレン構造を有する抗生物質であり、その作用はバクテリアのリボソ

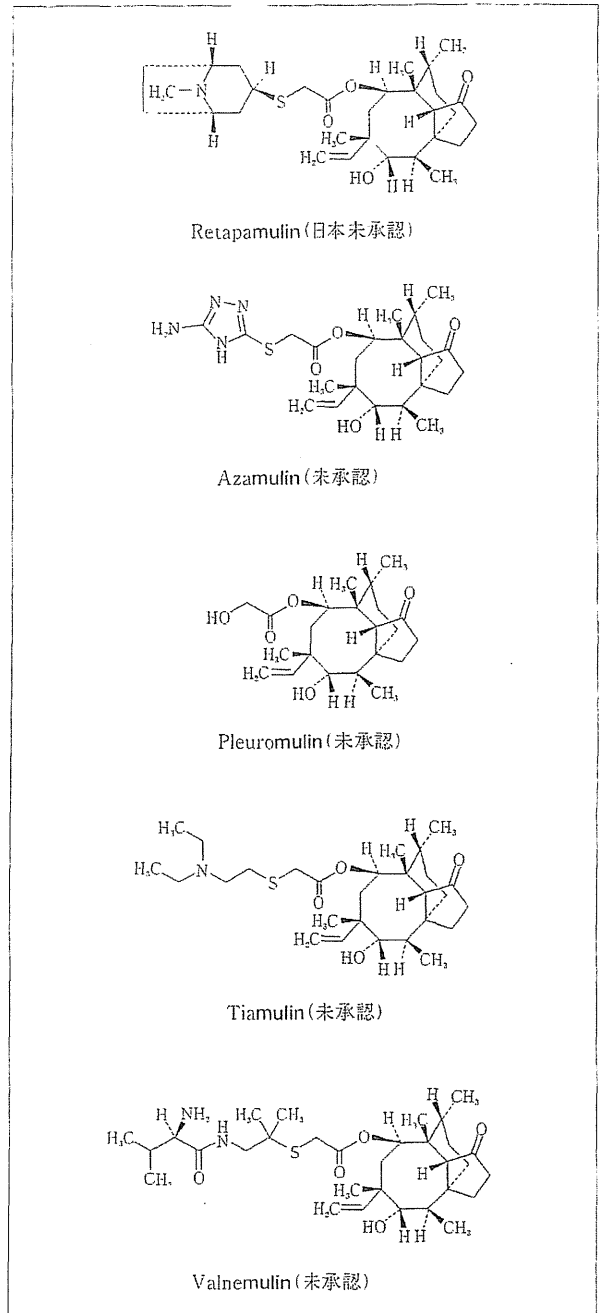


図4 プレウロムリン系抗生物質を示すステム「-mulin」を持つ医薬品

ーム50Sサブユニットに選択的に結合しタンパク質合成を阻害させることに起因する。他の抗生物質とは異なり、結合部位がペプチド転移の中心に存在するため、ペプチドの転移が阻害され、活性な50Sサブユニットの正常な形成が阻止されるとされている。

INNリストには、Retapamulin, Azamulin, Pleuromulin, Tiamulin, Valnemulinが収載されている。Retapamulinは半合成医薬品でありPleuromulinのヒド

ロキシアセチル側鎖の水酸基部位が8-メチル-8-アザビシクロ [3. 2. 1] オクチルチオ基に置換された化合物である。欧米で承認され、米国では *Staphylococcus aureus* または *Streptococcus pyogenes* の感受性系統による膿痂疹の局所的治療を適応として承認され、塗布薬として用いられているが、日本では未承認である。その他の医薬品も未承認である。

図4にプレウロムリン系抗生物質を示すステム「-mulin」を持つ医薬品の例を示す。

## 「-nabant」： カンナビノイド受容体拮抗薬

「-nabant」は、カンナビノイド受容体拮抗薬を示すステムである。関連するステムに本連載第46回で紹介したカンナビノール誘導体を示すステム「-nab-」(Pharm Tech Japan, Vol.26, No.6, 949(2010)参照)が

ある。

カンナビノイド受容体は7回膜貫通Gタンパク質(Gi/Go)共役型の受容体であり、CB1受容体とCB2受容体の2種が存在する。CB1受容体は、一部は末梢の消化管等に発現しているものの、主には脳に発現しており、神経伝達の抑制的制御に関与していると考えられている。一方、CB2受容体は脾臓や扁桃腺など、免疫系の臓器や細胞に多く発現しており、炎症反応や免疫応答の調節に関与していると考えられている。このうち、創薬標的となっている受容体はCB1受容体であり、多くのカンナビノイドCB1受容体拮抗薬の開発が試みられた。JANリストに記載されている品目はないが、INNリストには Rimonabant, Drinabant, Ibipinabant, Otenabant, Rosonabant, Surinabant, Taranabant が記載されている。これらの化合物は構造的に類似しており、ジアリルピラゾールあるいはその類縁体である。

Rimonabantは、欧州では抗肥満薬として市販された

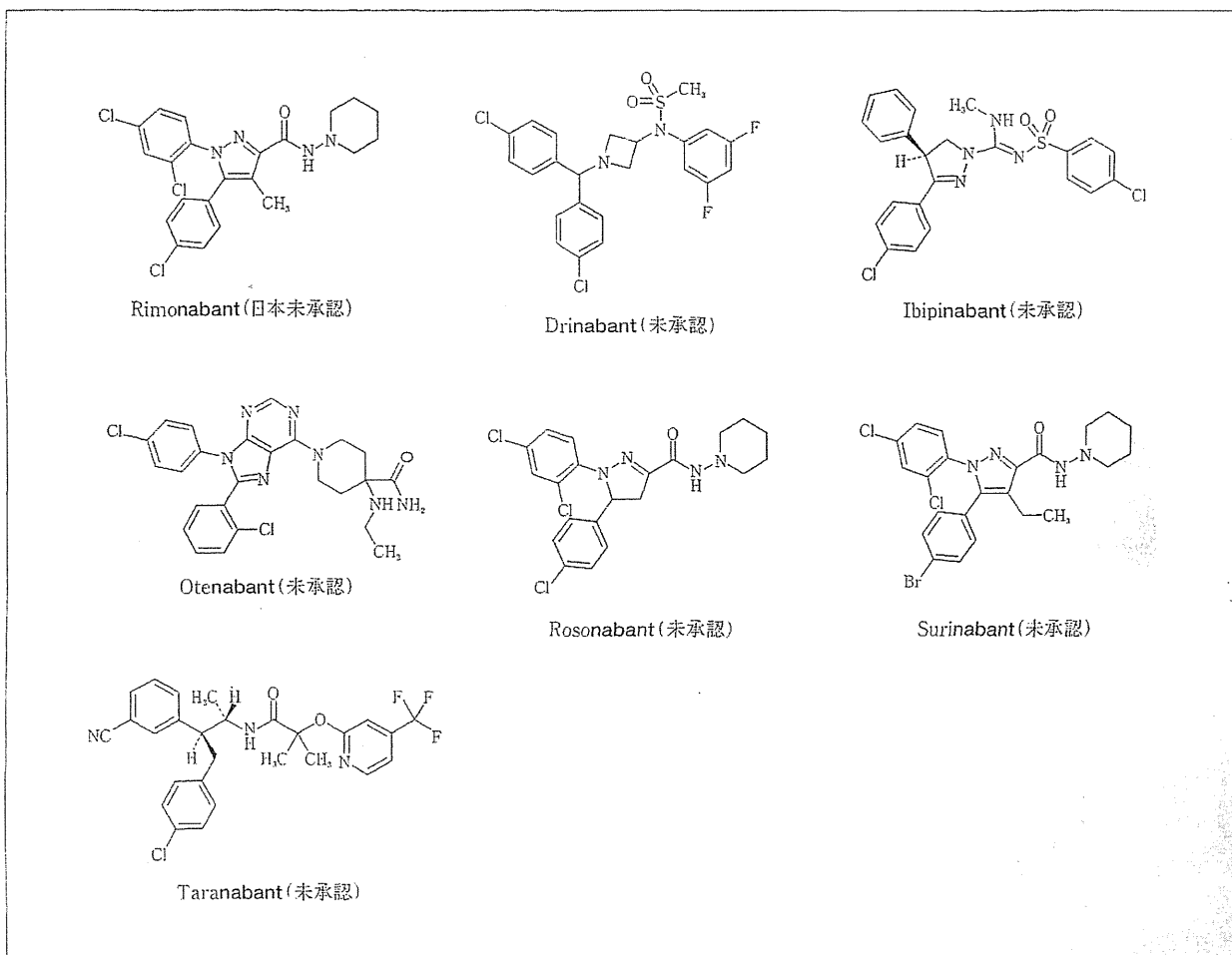


図5 カンナビノイド受容体拮抗薬を示すステム「-nabant」を持つ医薬品

STEMを知らば薬がわかる

図6

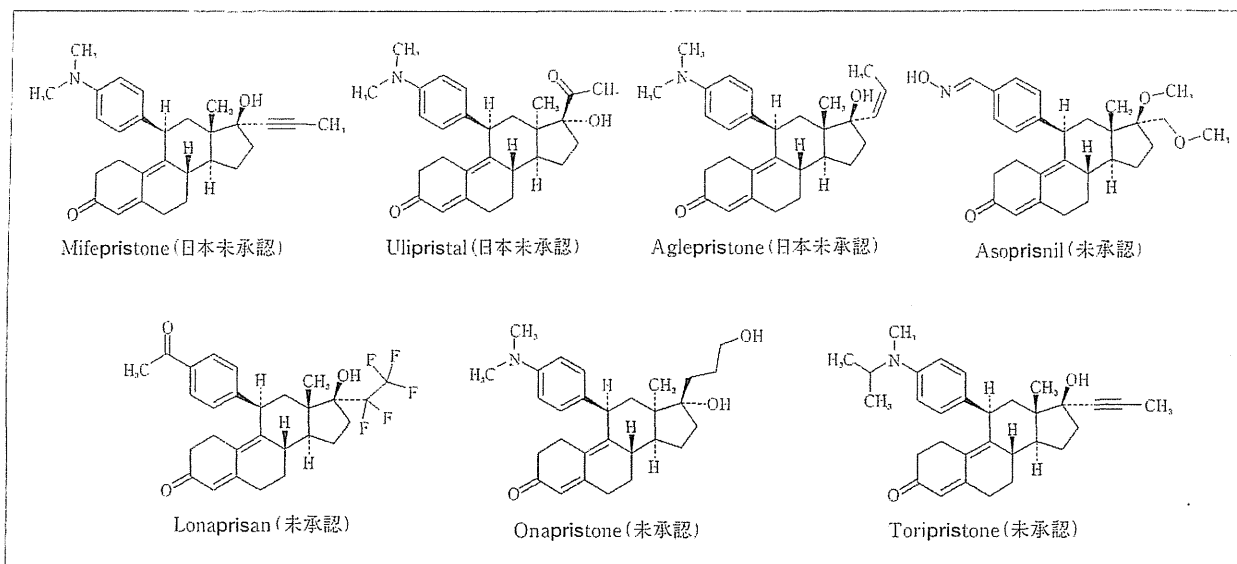


図6 プロゲステロン受容体作用性ステロイド(STEM「-gest-」を有する化合物を除く)を示すSTEM「-pris-」を持つ医薬品

が、うつおよび自殺企図のため2008年には発売中止となった。米国においても承認に至っていない。Drinabantはアルツハイマー病、パーキンソン病のほか、肥満症、2型糖尿病などの脂質代謝異常を適応として開発が進んでいる。

図5にカンナビノイド受容体拮抗薬を示すSTEM「-nabant」を持つ医薬品の例を示す。

**「-pris-」：プロゲステロン受容体作用性ステロイド(STEM「-gest-」を有する化合物を除く)**

「-pris-」は、プロゲステロン受容体に作用するステロイド化合物のうち、本連載第35回で紹介した黄体ホルモン(プロゲステン)類を示すSTEM「(-)gest(-)」(Pharm Tech Japan, Vol.25, No.7, 1354(2009)参照)を有する化合物以外の医薬品を示すSTEMである。

INNリストには、Mifepristone, Ulipristal, Aglepristone, Asoprisnil, Lonaprisan, Onapristone, Toripristoneなどが収載されているが、JANに収載されている品目はない。

Mifepristoneは、プロスタグランジン製剤との併用において、フランスで1988年に中絶促進薬として上市され、その後ヨーロッパ各国、ロシアおよび中国でも上市された。2000年妊娠初期の人工中絶薬として米国での販売が

認可されている。Ulipristalは、EUでは緊急避妊を適応として2009年に承認された。米国でも2009年に承認申請されている。

図6にプロゲステロン受容体作用性ステロイド(STEM「-gest-」を有する化合物を除く)を示すSTEM「-pris-」を持つ医薬品の例を示す。

**「-tril/-trilat」：中性エンドペプチダーゼ(NEP)阻害薬**

「-tril/-trilat」は、中性エンドペプチダーゼ(NEP)阻害薬を示すSTEMである。中性エンドペプチダーゼ(neprilysin(E.C.3.4.24.11)としても知られている)は、Na<sup>+</sup>利尿ペプチドの分解に参与しているペプチダーゼである。本ペプチダーゼの阻害は、Na<sup>+</sup>利尿ペプチドの代謝を遅延させ、利尿効果を惹起することが期待される。中性エンドペプチダーゼ(NEP)阻害薬は、Na<sup>+</sup>利尿ペプチドの代謝を遅延させるとともに、さらにアンジオテンシン変換酵素(ACE)を阻害することから、高血圧治療薬として開発が進められている。しかし、現在までに、本効能あるいは関連する効能で承認されている医薬品はない。

JANリストには、Candoxatril(カンドキサトリル)、Omapatrilat(オマパトリラト)が収載されている。また、INNリストには、Candoxatrilat, Dexecadotril, Ecadotril, Racecadotril, Fasidotril, Daglutril,

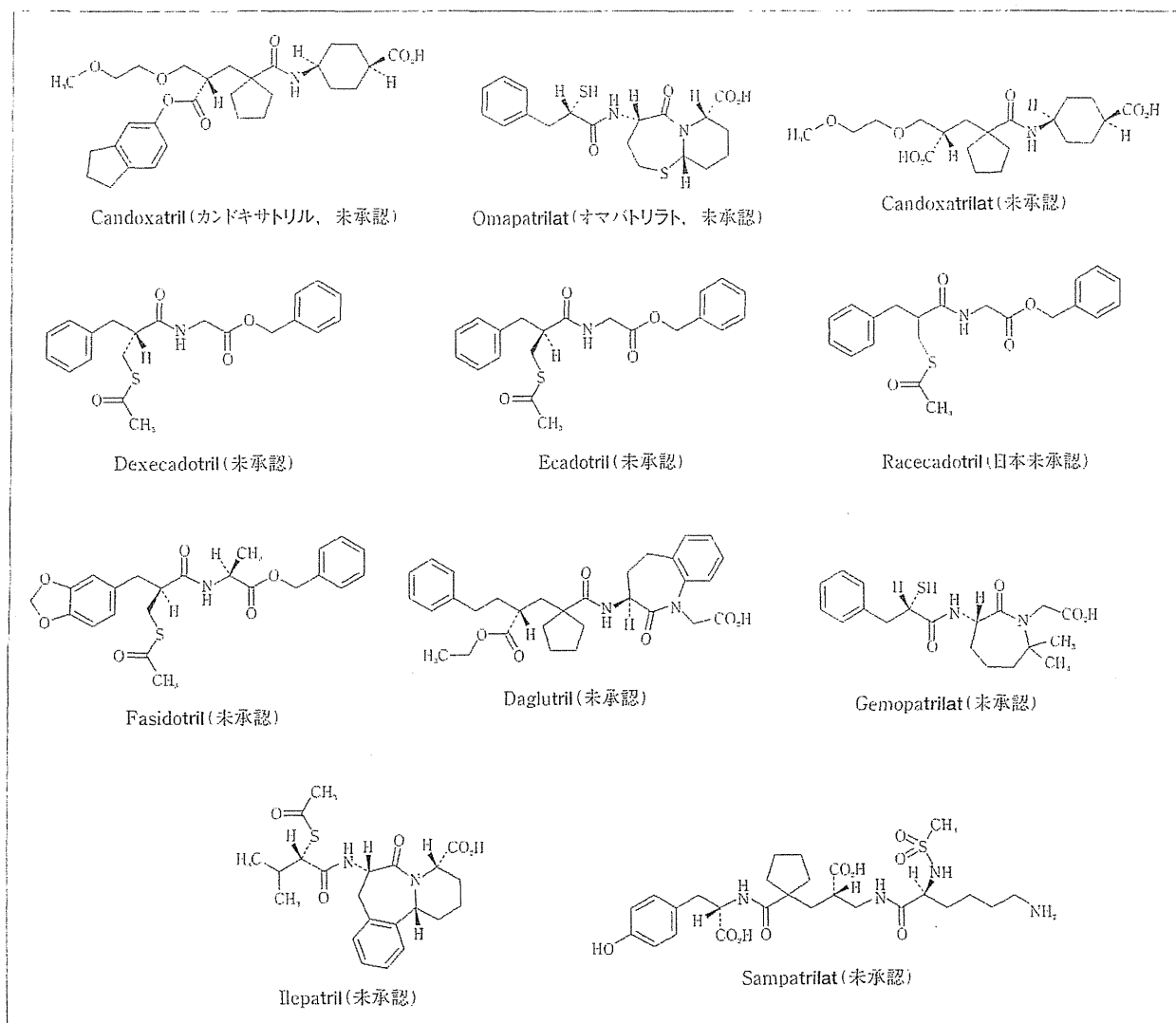


図7 中性エンドペプチダーゼ(NEP)阻害薬を示すステム「-tril/-trilat」を持つ医薬品

Gemopatrilat, Ilepatril, Sampatrilatが記載されている。

ステム「-tril/-trilat」は、INNリストではさらにサブシステム「-dotril」、「-lutril」、「-patril/-patriat」に分類されている。「-dotril」は、2-(3-phenylpropanamido)-acetic acid類のエステル誘導体、「-patril/-patriat」はazepineあるいはpyridoazepine誘導体類を示していることが多い。

カンドキサトリルは、Candoxatrilatのプロドラッグである。DexecadotrilとEcadotrilはエナンチオマーの関係にあり、Racecadotrilは両者のラセミ体である。興味深いことに、エナンチオマー間で薬理作用が異なり、R体(Dexecadotril)は腸においてantisecretory actionを有するのに対してS体(Ecadotril)はNEPとACEに対する阻害作用を有する。ラセミ体であるRacecadotrilはフラ

ンスで整腸剤として使用されている。

図7に中性エンドペプチダーゼ(NEP)を示すステム「-tril/-trilat」を持つ医薬品の例を示す。

## 「-viroc」： CCR5(ケモカイン CC モチーフ 受容体5) 受容体拮抗薬

「-viroc」は、CCR5(ケモカイン CC モチーフ 受容体5)受容体拮抗薬を示すシステムであり、本連載第42回で紹介した抗ウイルス薬を示すステム「-vir-」(Pharm Tech Japan, Vol.26, No.1, 75(2010)参照)のサブシステムである。CCR5受容体は、マクロファージの細胞表面にあるタンパク質の1つでケモカイン受容体の1つであ



STEMを知れば薬がわかる

第15回

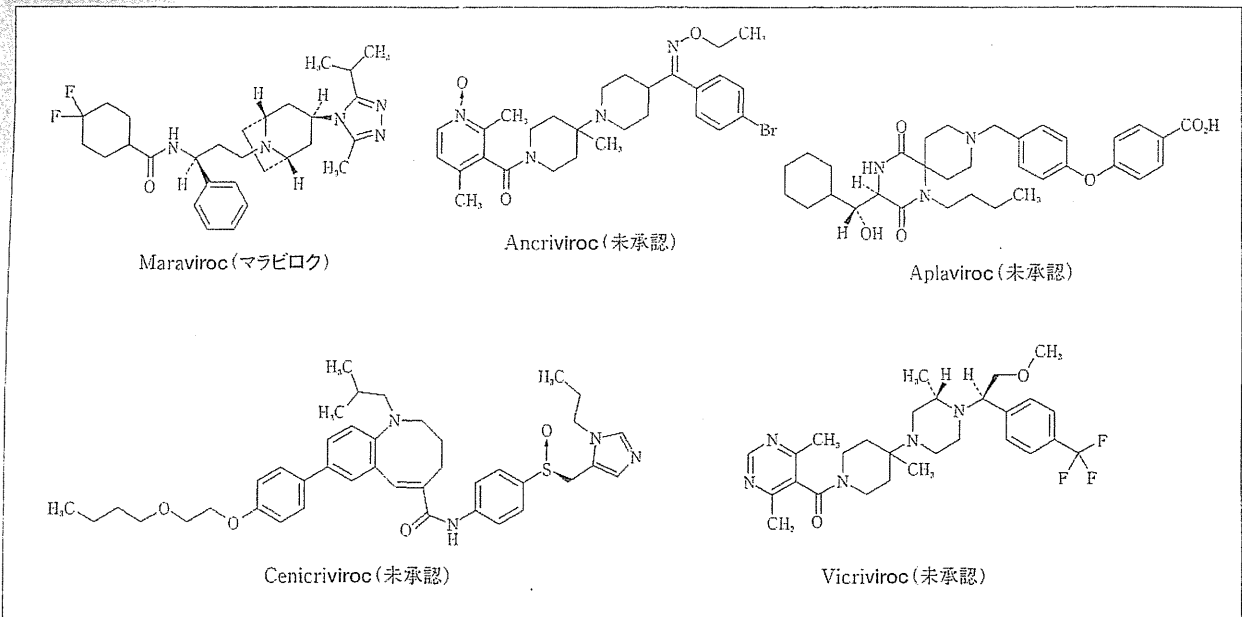


図8 CCR5受容体拮抗薬を示すSTEM「-viroc」を持つ医薬品

る。CCR5指向性HIV-1は、CD-4と結合後、さらにCCR5と結合し、宿主細胞に接着、侵入する。

わが国ではMaraviroc(マラビロク)がCCR5指向性HIV-1感染症に用いられている。マラビロクは、細胞膜上のCCR5に選択的に結合し、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120とCCR5との相互作用を遮断することにより、CCR5指向性HIV-1の細胞内への侵入を阻害するとされている。INNリストには他にAncriviroc, Aplaviroc, Cenicriviroc, Vicrivirocが記載されている。CenicrivirocやVicrivirocは開発中であるが承認には至っていない。

図8にCCR5受容体拮抗薬を示すSTEM「-viroc」を持つ医薬品の例を示す。



「-enicokin」：  
インターロイキン-21類

「-enicokin」はインターロイキン-21類を示すSTEMであり、本連載第5回で紹介したサイトカイン/インターロイキン類を示すSTEM「-kin」(Pharm Tech Japan, Vol.22, No.13, 2486(2006)参照)のサブシステムとして新規に記載された。

インターロイキン-21は、活性化T細胞から分泌されるサイトカインで、免疫細胞である細胞障害性T細胞やナチュラルキラー細胞、B細胞、樹状細胞を活性化し、

細胞性免疫、液性免疫の両方を増強する作用を示す。

INNリストにはDenenicokinが記載されている。Denenicokinは、遺伝子組換えメチオニルヒトインターロイキン-21で134個のアミノ酸残基からなる。転移性メラノーマの治療薬として開発中である。



「-tridecacog」：  
血液凝固第XIII因子

「-tridecacog」は血液凝固第XIII因子を示すSTEMであり、本連載第15回で紹介した血液凝固因子類を示すSTEM「-cog」(Pharm Tech Japan, Vol.23, No.11, 2188(2007)参照)のサブシステムである。

血液凝固第XIII因子は、フィブリン安定化因子とも呼ばれる酵素前駆体である。酵素活性を有する分子量約75,000のa鎖とキャリアタンパク質である分子量約80,000のb鎖が2本ずつ会合したa<sub>2</sub>b<sub>2</sub>の4量体として存在し、血液凝固系の最終段階でトロンビンによりa鎖とb鎖が分離され、トランスグルタミナーゼ活性を持つ活性型の第XIIIa因子となる。第XIIIa因子はフィブリン間の架橋を形成してフィブリン塊を安定化させる作用を示す。

INNリストにはCatridecacogが記載されている。Catridecacogは遺伝子組換え第XIII因子a鎖のホモダイマーであり、先天性第XIII因子欠損症の治療薬および心臓外科手術時の出血予防薬として開発中である。

表1 標的とサブシステム

標的	サブシステム	
	改訂前	改訂後
細菌類	-ba(c)-	-b(a)-
心臓血管系	-ci(r)-	-c(i)-
菌類	なし	-f(u)-
インターロイキン類	なし	-k(i)-
免疫調節分子	-li(m)-	-l(i)-
神経系分子	なし	-n(e)-
骨	-os-	s(o)-
トキシソ	なし	-tox(a)-
腫瘍	-tu(m)-	-t(u)-
ウイルス	-vi(r)-	-v(i)-
炎症性病変	-le(s)-	削除

### 「-mab」：モノクローナル抗体

本連載第7回で紹介したように、「-mab」はモノクローナル抗体(monoclonal antibody)を表すシステムである(Pharm Tech Japan, Vol.23, No.2, 283(2007)参照)。「-mab」は、完全抗体だけでなく、Fab, (ab)<sub>2</sub>などの

抗体断片や、一本鎖抗体(scFv)などに対しても用いられる。INNリストに記載されているモノクローナル抗体は約200品目にも上り、INN委員会は2009年、モノクローナル抗体の命名法を一部見直した(表1)。

まず、標的が菌類、インターロイキン類、および神経系分子であることを示すサブシステムとして、「-f(u)-」、「-k(i)-」、および「-n(e)-」がそれぞれ追加された。また、細菌類、心臓血管系、骨、ウイルス、および免疫調節分子を示すサブシステムが、それぞれ「-b(a)-」、「-c(i)-」、「-s(o)-」、「-v(i)-」、および「-l(i)-」に簡略化された。さらに、炎症性病変を示すサブシステム「-le(s)-」が削除された。腫瘍を標的とする抗体には、標的組織ごとにサブシステムが与えられていたが、2009年の見直しにより、サブシステムは「-t(u)-」に統一された。なお、これらの変更は、以前に決まっていたINNには波及しない、すなわち、既存のINNは変更されない。構造遺伝子の由来(種)を示す主なサブシステムには、従来通りマウス抗体「-omab」、キメラ抗体「-ximab」、ヒト化抗体「-zumab」、

表2 JANリスト掲載抗体医薬品の標的分子、適応疾患、国内承認年等 \*欧米での適応疾患

種	INN	JAN	標的分子	適応疾患	日本承認年	備考
マウス	Muromonab-CD3	ムロモナブ-CD3	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1991	米国承認
	Ibritumomab Tiuxetan	イブリツモマブチウセタン	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2008	欧米承認
キメラ	Abciximab	アブキシマブ	GPIIb/IIIa	心筋虚血*		米国承認
	Rituximab	リツキシマブ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2001	欧米承認
	Basiliximab	バシリキシマブ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	2002	欧米承認
	Infliximab	インフリキシマブ	TNF $\alpha$	関節リウマチ	2002	欧米承認
	Cetuximab	セツキシマブ	EGFR	頭頸部がん、結腸・大腸がん	2008	欧米承認
ヒト化	Palivizumab	パリーブズマブ	RSV Fタンパク質	RSウイルス感染	2002	欧米承認
	Trastuzumab	トラスツズマブ	HER2	転移性乳がん	2001	欧米承認
	Gemtuzumab Ozogamicin	ゲムツズマブオゾガマイシン	CD33	急性骨髄性白血病	2005	2000年米国承認、2010年取下げ
	Omalizumab	オマリズマブ	IgE	喘息	2009	欧米承認
	Bevacizumab	ベバシズマブ	VEGF	結腸・直腸がん	2007	欧米承認
	Tocilizumab	トシリズマブ	IL-6R	キャッスルマン病・関節リウマチ	2005	欧米承認
	Ranibizumab	ラニビズマブ	VEGF-A	加齢黄斑変性	2009	欧米承認
	Eculizumab	エクリズマブ	C5	発作性夜間血色素尿症	2010	欧米承認
	Pertuzumab	ヘルツズマブ	HER2			
	Certolizumab Pegol	セルトリズマブパゴル	TNF $\alpha$	クローン病* 関節リウマチ		欧米承認
ヒト	Adalimumab	アダリムマブ	TNF $\alpha$	関節リウマチ	2008	欧米承認
	Panitumumab	パニツムマブ	EGFR	結腸・直腸がん	2010	欧米承認
	Golimumab	ゴリムマブ	TNF $\alpha$	関節リウマチ*		日本申請中 欧米承認
	Ustekinumab	ウステキヌマブ	IL-12, IL-23 p40	乾癬*		日本申請中 欧米承認
	Ofatumumab	オフアツムマブ	CD20	慢性リンパ性白血病*		米国承認 欧州申請中

ステムを知れば薬がわかる

最終回

およびヒト抗体「-umab」が用いられる。これまで、抗腫瘍作用および免疫調節作用をもつヒト抗体は、それぞれ「-tumumab(-ツムマブ)」および「-limumab(-リムマブ)」と命名されてきたが、今後は「-tumab(-ツムマブ)」および「-lumab(-ルマブ)」と短縮されることになり、日本語で表記したときヒト抗体であることがわかりにくくなるので、注意が必要である。合成化合物やトキシンが共有結合したモノクローナル抗体は、抗体名の後に化合物やトキシンの名前を続けた2語式で命名される。トキシンが共有結合している場合は、接尾語に「-tox(a)-」をつける。また、モノクローナル抗体を放射性同位体のキャリアとして用いる場合は、放射性同位体のINNを抗体名の前につける(例, Technetium (<sup>99m</sup>Tc) pintumomab)。ポリエチレングリコール(PEG)が結合した抗体は、「-pegol」などを用いた2語式で命名されることが望ましい(例, Cerutolizumab pegol)。

本連載第7回(2007年)以降にわが国で承認されたモノクローナル抗体には、マウス抗体Ibritumomab Tiuxetan(イブリツモマブ チウキセタン)、キメラ抗体Cetuximab(セツキシマブ)、ヒト化抗体Omalizumab(オマリズマブ)、Bevacizumab(ベバシズマブ)、Ranibizumab(ラニビズマブ)、Eculizumab(エクリズマブ)、ヒト抗体Adalimumab(アダリムマブ)、Panitumumab(パニツムマブ)がある(表2)。また、ヒト化抗体Certolizumab Pegol(セルトリズマブ ペゴル)、Pertuzumab(ペルツズマブ)、Golimumab(ゴリムマブ)、Ustekinumab(ウステクヌマブ)、Ofatumumab(オフアツムマブ)がJANリストに収載された。

以上、今回は、2009年に新たに収載されたステム「-ciguat」, 「-gliptin」, 「-mapimod」, 「-rolimus」, 「-mulin」, 「-nabant」, 「-pris-」, 「-tril/-trilat」, 「-viroc」, 「-enicokin」, 「-tridecacog」を紹介するとともに、2009年に行われたモノクローナル抗体を示すステム「-mab」のサブステムの変更を紹介した。

おわりに

本連載第1回(Pharm Tech Japan, Vol. 22, No.9, 1675(2006))で紹介したように、WHOは、世界共通で誰でも自由に使用できる医薬品の固有名称(国際一般名, International Nonproprietary Name, INN)を選定する

ことにより、医薬品の円滑な国際的流通と管理/品質保持を図る目的で、1953年に医薬品の国際命名要綱を発表した。それを受け国際一般名称(INN)委員会が発足し、INN選定作業が始まった。1953年には281品目の医薬品のINNが定められた。以降、2010年5月までに50回のINN委員会が開催され、8,000を超える医薬品(原薬)のINNが決定している。これらのINNは、WHOのweb site (WHO MedNet : 要登録)で公開されており自由に検索できる<sup>3)</sup>。また、医薬品の国際一般名に使われるステムに関する資料“The use of stems in the selection of International Nonproprietary names (INN) for pharmaceutical substances, 2009”および“International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances 2009”は、WHOのwebサイトからダウンロードできる<sup>1,2)</sup>。

最後に、本連載が滞りなく最終回を迎えることができましたのは、本誌編集長Nさんの心温まる叱咤激励のおかげです。心より感謝します。

参考文献

- 1) The use of stems in the selection of International Nonproprietary names (INN) for pharmaceutical substances 2009, WHO/EMP/QSM/2009.3, <http://www.who.int/medicines/services/inn/StemBook2009.pdf>
- 2) International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances 2009, INN Working Document 05.179, 08/11/2009, [http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRevdoc2009\\_11.pdf](http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRevdoc2009_11.pdf)
- 3) <http://mednet.who.int/login.aspx?ReturnUrl=%2f>  
また、本稿作成に関してこれまでに紹介した文献を使用した。

筆者紹介

奥田晴宏

厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所有機化学部長。独立行政法人医薬品医療機器総合機構のJAN専門協議委員および医薬品名称委員会委員。2005年よりWHOのINN委員会委員。

川崎ナナ

厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長。独立行政法人医薬品医療機器総合機構のJAN専門協議委員および医薬品名称委員会委員。2008年よりWHOのINN委員会のバイオアドバイザー。

内田恵理子

厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞薬部第一室長。独立行政法人医薬品医療機器総合機構のJAN専門協議委員および医薬品名称委員会委員。

山本美智子

独立行政法人医薬品医療機器総合機構 安全第一部テクニカルエキスパート。医薬品情報専門薬剤師検討委員。くすりの適正使用協議会専門委員。また、2008年より鈴鹿医療科学大学薬学部客員准教授を兼務。

宮田直樹

名古屋市立大学大学院薬学研究科教授。独立行政法人医薬品医療機器総合機構のJAN専門協議および医薬品名称委員会の座長。1995年から2005年までWHOのINN委員会委員。

Kumiko Sakai-Kato<sup>1</sup>  
Shigenori Ota<sup>2</sup>  
Kenji Hyodo<sup>3</sup>  
Hiroshi Ishihara<sup>3</sup>  
Hiroshi Kikuchi<sup>3</sup>  
Toru Kawanishi<sup>1</sup>

## Short Communication

# Size separation and size determination of liposomes

<sup>1</sup>Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo, Japan  
<sup>2</sup>R&D Department, GL Sciences Inc., Iruma, Saitama, Japan  
<sup>3</sup>DDS Research, Formulation Research Laboratories, Pharmaceutical Science and Technology Unit, Eisai Co. Ltd., Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan

We developed a method for separating liposomes by size and determining their average diameters. Liposomes with different average diameters were separated on a monolithic silica capillary column, and the size of the liposomes corresponding to each peak was determined online with a dynamic light scattering detector coupled to the capillary liquid chromatography system. The calculated diameters for the separated liposomes were similar to the diameter values measured in batch mode. We demonstrate that this combination of a monolithic capillary column and light scattering detection could be used for size separation of liposomes and could provide more details about average diameters than batch-mode analysis.

Received May 13, 2011  
Revised June 13, 2011  
Accepted June 14, 2011

**Keywords:** Capillary liquid chromatography / Light scattering detection / Liposomes / Monolithic column  
DOI 10.1002/jssc.201100417

## 1 Introduction

Advances in nanotechnology have contributed to the development of modern drug carrier systems, such as liposomes [1] and polymeric micelles [2, 3], that play an important role in the controlled delivery of pharmacological agents to their targets at a therapeutically optimal rate and dose [4]. Exact knowledge of the sizes of these nanoparticles is essential because size can substantially affect physicochemical and biopharmaceutical behavior. For example, variations in particle size can affect drug release kinetics, transport across biological barriers, and pharmacokinetics in the human body [5–7].

Among the methods for the characterization of macromolecules, flow-assisted techniques, such as size-exclusion chromatography (SEC) [8, 9], hydrodynamic chromatography [10, 11], field-flow fractionation [12–14], and capillary hydrodynamic fractionation [15], are suitable for separation on the basis of differences in the physical size indexes of the analytes. Electrophoretic separation methods are also used for separation and characterization of colloids that are charged in buffered aqueous solutions [16–18].

SEC is the most commonly used fractionation method for particle sizing. Usually, SEC is performed on a column packed with polymer gel or porous silica microparticles with various pore-size distributions. Polymer samples are separated with such packed SEC columns [8], and nanoparticu-

late drug carriers, such as liposomes, are often separated from small solutes by means of SEC [19].

Recently, macromolecules, such as a polystyrene polymer, were separated on monolithic silica columns by SEC [20]. Monolithic columns have received much attention as a new technology for HPLC and capillary electrochromatography [21, 22]. These columns consist of a single piece of porous material (most often polymer- or silica-based) with a bimodal pore structure consisting of through-pores (pore size ~1.5–5 μm) and mesopores in the skeleton (~10–25 nm) [23]. Because of the high porosity of the monolithic columns, they can be lengthened, thus leading to high separation efficiency.

Although the elution profile obtained by means of SEC provides insight into size distribution, it does not give information about absolute particle size. Dynamic light scattering (DLS), also known as photon correlation spectroscopy, is a non-invasive technique for measuring the size of molecules and particles, typically in the submicron region; and with the latest technology, particles sizes of <1 nm have been measured. DLS is routinely used for size and polydispersity measurements, along with aggregate quantification.

In this report, we describe a system that combines the high resolution of capillary LC with acquisition of absolute diameter data by means of DLS for the online size separation and size determination of liposomal formulations. Although a system using conventional LC coupled with DLS has already been reported [24], ours is the first system that uses capillary LC coupled with DLS.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Liposome preparation

Liposome samples were prepared by an extrusion procedure. A lipid film containing dipalmitoylphosphatidylcholine,

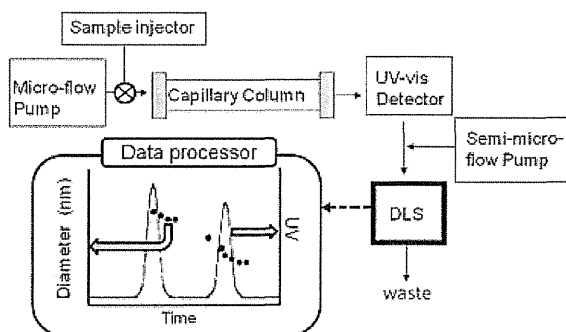
**Correspondence:** Dr. Kumiko Sakai-Kato, Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
**E-mail:** kumikato@nihs.go.jp  
**Fax:** +81-3-3700-9662

**Abbreviations:** DLS, dynamic light scattering; SEC, size-exclusion chromatography

cholesterol, and dipalmitoylphosphatidylglycerol (30:40:30, lipid content 20 mM) was suspended in 9.5% sucrose. The suspension was extruded through 200-, 100-, 80-, and 50-nm polycarbonate membranes in that order. Extrusions at every pore size were repeated. Extruded liposome samples were stored in the refrigerator. Samples were dissolved or dispersed in eluent and filtered through a 0.20- $\mu\text{m}$  filter (Millex-LG, Millipore, Tokyo, Japan) prior to being applied to the columns. We used two liposomes with average diameters of 77 and 155 nm, as measured by batch-mode analysis in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing methanol (5% v/v), which was also the solvent used as the chromatography eluent.

## 2.2 LC conditions

The schematics of the analytical system we developed are shown in Fig. 1. Separation was performed with a capillary LC system equipped with a capillary LC micro-flow pump (MP711V; GL Sciences, Tokyo, Japan), a four-port internal sample injector (fixed volume 10 nL; Valco Instrument, Houston, TX, USA), and a capillary ultraviolet–visible (UV–vis) detector (MU701; GL Sciences). Samples were analyzed on a MonoCap Amide column (500 mm  $\times$  0.2 mm id; mesopore size  $\sim$ 15 nm or  $\sim$ 20 nm; GL Sciences). The total porosity of the column was estimated using void times of hollow capillary column and monolithic capillary column, and total volume of the column. The eluent was 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing methanol (5% v/v). The eluent was delivered at a flow rate of 0.1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , and the column was kept at room temperature. The capillary UV–vis detector was operated at a wavelength of 210 nm. A sample volume of 10 nL was injected for each analysis. Downstream of the UV–vis detector, the same eluent was added by means of a semi-micro-flow pump (NanoSpace 3101 SI-2, Shiseido, Tokyo, Japan) through a T-joint to increase the flow rate. At the increased flow rate, the eluate



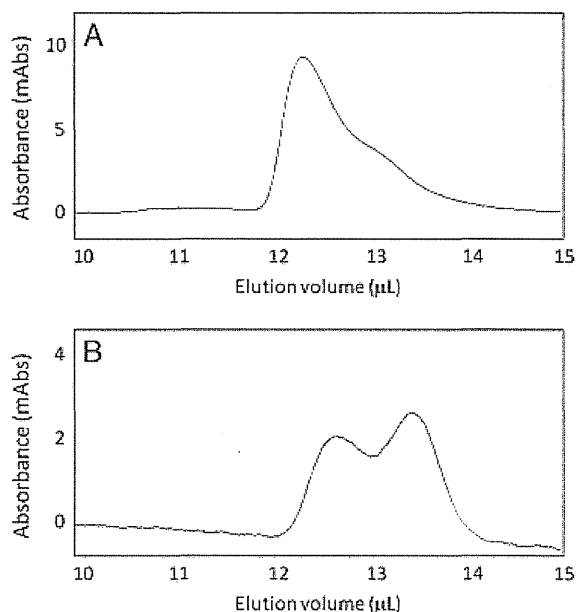
**Figure 1.** Schematic of analytical system for size separation of liposomes and determination of their average diameters. Samples were injected onto a monolithic capillary column and detected by a microLC UV–vis detector. The flow rate was increased downstream of the detector by means of a semi-micro-flow pump. At the increased rate, the eluate from the UV detector flowed continuously into the DLS detector.

from the UV–vis detector continuously flowed into the flow cell of a DLS detector via a reducing joint (2 mm, 1/16 inch, GL Sciences). Zetasizer Software was used to calculate the average diameters of the liposomes. A real-time parameter reading from the external device (the UV–vis detector in this case) can be also directly introduced into the optics unit and added to the light scattering sample record.

## 3 Results and discussion

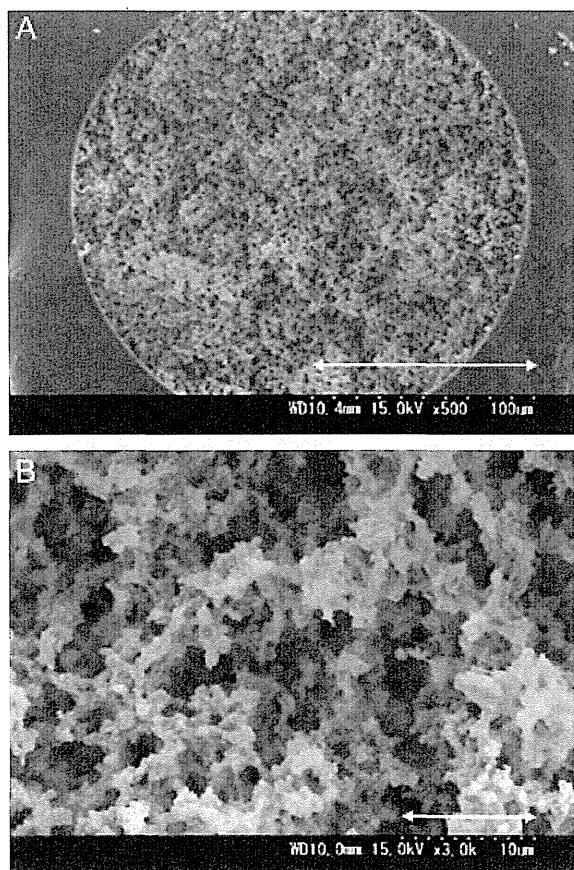
### 3.1 Separation of liposomes on the monolithic capillary column

In this report, we used the monolithic column which consisted of silica derivatized with an amide group, a neutral hydrophilic group that prohibits adsorption of the samples on the silica monolith by ion-exchange interactions and that permits the analysis of charged soft nanocarriers, such as liposomes derived from biomaterials. As the eluent, 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing methanol (5% v/v) was used. We attempted to separate liposomes with two different average diameters on a monolithic column with mesopore size of  $\sim$ 15 nm. However, this column did not effectively separate the liposomes (Fig. 2A). When we used a monolithic column with larger mesopores (average size  $\sim$ 20 nm), the resolution was improved (Fig. 2B). Because total porosity is also

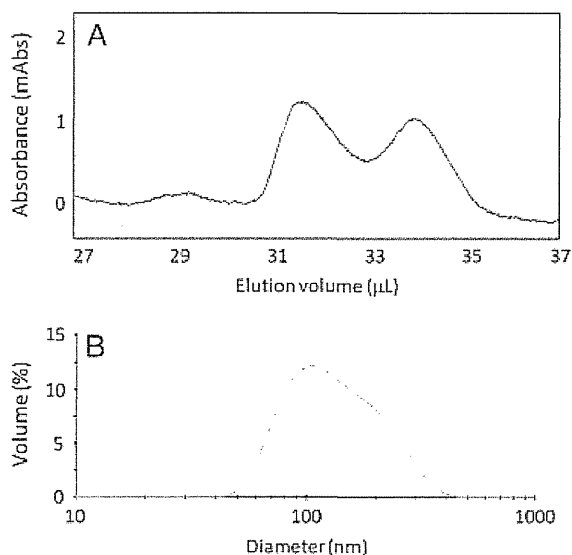


**Figure 2.** Effect of mesopore size on the separation of liposomes on monolithic columns with (A)  $\sim$ 15-nm mesopores and (B)  $\sim$ 20-nm mesopores. Column: capillary EX nano MonoCap Amide (500 mm  $\times$  0.2 mm id); eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 5% methanol; sample: mixture of liposomes with diameters of 155 and 77 nm, as determined by batch measurement; flow rate: 0.1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; detection wavelength: 210 nm.

increased from 88 to 95%, it is presumed that an increase in throughpore volumes also contributed to the improvement of resolution. SEM images of the latter monolithic column showed the presence of rough surfaces (micron and submicron ranges; Fig. 3). Typically, monolithic columns are more porous than conventional columns packed with spherical particles, and the higher porosity results in much lower column backpressure. Furthermore, the throughpore/skeleton size ratio of 2–4 for the monolithic column was much greater than the 0.25–0.4 ratio typical of columns packed with particles [25]. This higher ratio permits the use of a long column and thus high separation efficiency [26]. Therefore, we connected three 500-mm columns (total length 1500 mm) and then tried the separation again. As expected, the resolution was further improved (Fig. 4A), and the column pressure was only 1.5 MPa. In contrast, the same two liposomes could not be separated by batch-mode DLS analysis (Fig. 4B), and these results show the usefulness of the monolithic column. Also, there is no report that SEC using conventional LC can obtain such a high resolution of liposomes with two different average diameters within 100-nm range. We could not separate liposomes with two different average sizes (111 and 77 nm)



**Figure 3.** Scanning electron micrographs of monolithic capillary columns. Scale bars correspond to 100  $\mu\text{m}$  for (A) and 10  $\mu\text{m}$  for (B).

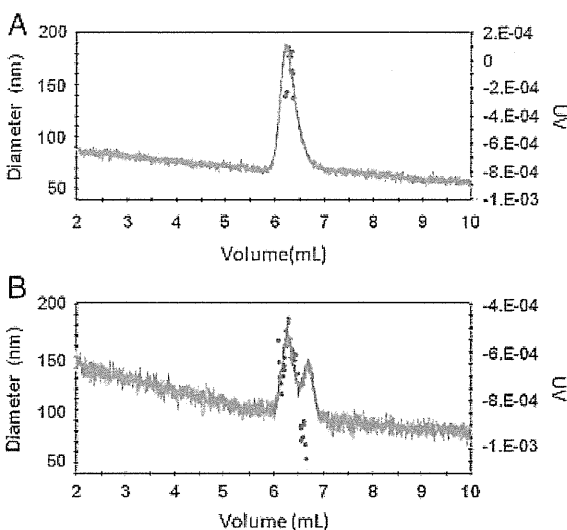


**Figure 4.** Analysis of liposomes in (A) flow-assisted mode and (B) batch mode. (A) Analysis in flow-assisted mode. Column: capillary EX nano MonoCap Amide (500 mm  $\times$  0.2 mm id)  $\times$  3; eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 5% methanol; sample: mixture of liposomes with sizes of 155 and 77 nm, as determined by batch measurement; flow rate: 0.1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; detection wavelength: 210 nm. (B) Analysis in batch mode with DLS detection. Sample: mixture of liposomes with diameters of 161 and 77 nm; dispersant: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 5% methanol.

(data not shown). Therefore, the separation of 80 nm size difference is possible by this system.

### 3.2 Online data acquisition by DLS

Next, we evaluated a system that combined capillary LC with DLS detection. The DLS data were accumulated continuously and analyzed every 3 s, and the software recorded all correlation functions and intensity values. Because the volume of the DLS flow cell was 135  $\mu\text{L}$  and the detection volume was 5  $\mu\text{L}$ , and the flow rate of the capillary LC system was  $< 1 \mu\text{L}/\text{min}$ , we increased the flow rate downstream of the UV–vis detector by adding the same eluent to the flow by means of a semi-micro-flow pump through a T-joint downstream of the detector. However, the flow was diluted by the additional eluent. Therefore, we examined the effect of the increased flow rate on the intensity of scattered light to make sure that DLS detection was still feasible at the higher flow rate. At flow rates ranging from 50 to 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , DLS detection was possible, and diameters of the liposomes could be calculated. Figure 5A shows the average diameter and external UV input for monodisperse liposomes injected onto the monolithic column. The system was operated at a flow rate of 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ . From the single peak that was detected, we calculated an average diameter of 166 nm, which was close to the expected value (155 nm) for this liposome dispersion, as indicated by batch-mode



**Figure 5.** Plots of diameters and UV absorption versus elution volumes for liposomes injected onto a monolithic column. Column: capillary EX nano MonoCap Amide (500 mm  $\times$  0.2 mm id); eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 5% methanol; sample: liposomes with diameters of (A) 155 nm and (B) mixture of liposomes with diameters of 155 and 77 nm as determined by batch measurement. Capillary LC flow rate: 0.1  $\mu$ L/min; semi-micro-flow pump flow rate: 50  $\mu$ L/min; detection wavelength: 210 nm. AU: arbitrary unit.

analysis. We ascribed the similarity of the values to the low column backpressure, which did not affect the diameter of liposomes. The run-to-run repeatability of the calculated diameter for the eluted sample was determined to be 1.2% (RSD,  $N = 3$ ). As far as I know, there have been no reports that the semi-micro-LC column or conventional column can separate liposomes with two different average diameters within 100-nm range. If we can use semi-micromonolithic LC column or conventional monolithic column long enough to separate liposomes with two different average diameters within 100-nm range, it is not required to dilute eluate from column before detector.

Next, we used the developed system to analyze a dispersion of liposomes with two different diameter ranges. Figure 5B shows the diameter and external UV input versus elution volumes for liposomes, separated onto a monolithic column. The size separation of the liposomes was good, and average diameters for the two detected peaks were calculated as 164 and 77 nm; these values were also similar to the values measured in batch mode, 155 and 77 nm, respectively.

#### 4 Concluding remarks

We developed a system for simultaneous size separation and size determination of liposomes using a capillary LC system with DLS detection. By changing the mesopore size, we could improve the separation of liposomes with different

average diameters. Because the column had a low backpressure, resolution could easily be increased by lengthening the column. After increasing the flow rate with a second pump, we used DLS detection to determine the diameters of the separated liposomes. Analysis with this system provided more-detailed information than conventional batch-mode analysis about the size of the liposomes, which affects their physicochemical and biopharmaceutical behavior.

The authors are grateful for financial support from the Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices Project (The Japan Health Sciences Foundation), a Health Labor Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW), and KAKENHI (21790046) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT), Japan.

The authors have declared no conflict of interest.

#### 5 References

- [1] Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C., *J. Mol. Biol.* 1965, 13, 238–252.
- [2] Nishiyama, N., Kataoka, K., *Pharmacol. Ther.* 2006, 112, 630–648.
- [3] Torchilin, V. P., Lukyanov, A. N., Gao, Z., Papahadjopoulos-Sternberg, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100, 6039–6044.
- [4] Ferrari, M., *Nat. Rev. Cancer.* 2005, 5, 161–171.
- [5] Hillyer, J. F., Albrecht, R. M., *J. Pharm. Sci.* 2001, 90, 1927–1936.
- [6] Lamprecht, A., Bouligand, Y., Benoit, J. P., *J. Control Release* 2002, 84, 59–68.
- [7] Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., Hoekstra, D., *Biochem. J.* 2004, 377, 159–169.
- [8] Kirkland, J. J., *J. Chromatogr. A.* 1976, 125, 231–250.
- [9] Huang, S. S., in: Wu, C.-S. (Eds.), *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques*, Marcel Dekker, New York 2004, p. 677.
- [10] Small, H., Colloid, J., *Interface Sci.* 1974, 48, 147–161.
- [11] Williams, A., Varela, E., Meehan, E., Tribe, K., *Int. J. Pharm.* 2002, 242, 295–299.
- [12] Giddings, J. C., *Science* 1931, 260, 1456–1465.
- [13] Giddings, J. C., *Anal. Chem.* 1995, 67, 592A–598A.
- [14] Moon, M. H., Park, I., Kim, Y., *J. Chromatogr. A* 1998, 813, 91–100.
- [15] Silebi, C. A., Dosramos, J. G., *J. Colloid. Interface Sci.* 1989, 130, 14–24.
- [16] VanOrman, B. B., McIntire, G. L., *J. Microcolumn Sep.* 1989, 1, 289–293.
- [17] Ahmadzadeh, H., Dua, R., Presley, A. D., Arriaga, E. A., *J. Chromatogr. A* 2005, 1064, 107–114.
- [18] Rezenom, Y. H., Wellman, A. D., Tilstra, L., Medley, C. D., Gilman, S. D., *Analyst* 2007, 132, 1215–1222.

- [19] Grabielle-Madelmont, C., Lesieur, S., Ollivon, M., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2003, *56*, 189–217.
- [20] Ute, K., Yoshida, S., Kitayama, T., Bamba, T., Harada, K., Fukusaki, E., Kobayashi, A., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., *Polymer J.* 2006, *38*, 1194–1197.
- [21] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., *Anal. Chem.* 1996, *68*, 3498–3501.
- [22] Peters, E. C., Petro, M., Svec, F., Frechet, J. M. J., *Anal. Chem.* 1998, *70*, 2296–2302.
- [23] Tanaka, N., Kobayashi, H., Nakanishi, K., Minakuchi, H., Ishizuka, N., *Anal. Chem.* 2001, *73*, 420A–429A.
- [24] Zetasizer nano application note, Absolute size exclusion chromatography, MRK877-01, Marvern. [http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB001244/\\$file/MRK877-01.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB001244/$file/MRK877-01.pdf).
- [25] Unger, K. K., *Porous Silica (Journal of Chromatography Library–vol. 16)*, Elsevier, Amsterdam 1979.
- [26] Miyamoto, K., Hara, T., Kobayashi, H., Morisaka, H., Tokuda, D., Horie, K., Koduki, K., Makino, S., Núñez, O., Yang, C., Kawabe, T., Ikegami, T., Takubo, H., Ishihama, Y., Tanaka, N., *Anal. Chem.* 2008, *80*, 8741–8750.



# Stabilization of Liposomes in Frozen Solutions Through Control of Osmotic Flow and Internal Solution Freezing by Trehalose

KEN-ICHI IZUTSU, CHIKAKO YOMOTA, TORU KAWANISHI

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

Received 22 September 2010; revised 7 December 2010; accepted 25 January 2011

Published online 16 February 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.22518

**ABSTRACT:** The purpose of this study was to elucidate the effect of trehalose distribution across the membrane on the freeze-related physical changes of liposome suspensions and their functional stability upon freeze–thawing. Cooling thermal analysis of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine liposome suspensions showed exotherm peaks of bulk (–15°C to –25°C) and intraliposomal (approx. –45°C) solution freezing initiated by heterogeneous and homogeneous ice nucleation, respectively. The extent of the intraliposomal solution freezing exotherm depended on liposome size, lipid composition, cosolutes, and thermal history, suggesting that osmotic dehydration occurred due to the increasing difference in solute concentrations across the membrane. A freeze–thawing study of carboxyfluorescein-encapsulated liposomes suggested that controlling the osmotic properties to avoid the freeze-induced intraliposomal solution loss either by rapid cooling of suspensions containing trehalose in both sides of the membrane (retention of the intraliposomal supercooled solution) or by cooling of suspensions containing trehalose in the extraliposomal media prior to freezing (e.g., osmotic shrinkage) led to higher retention of the water-soluble marker. Evaluation and control of the osmotically mediated freezing behavior by optimizing the formulation and process factors should be relevant to the cryopreservation and freeze-drying of liposomes. © 2011 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 100:2935–2944, 2011

**Keywords:** liposomes; formulation; stabilization; thermal analysis; osmosis; calorimetry (DSC); excipients; freeze-drying

## INTRODUCTION

The increase in the variety and clinical relevance of liposomal formulations has enhanced the importance of the freezing and freeze-drying processes for the distribution and long-term storage of the drug delivery systems that are not chemically and/or physically stable enough as aqueous suspensions.<sup>1–4</sup> These processes, however, expose the lipid systems to various stresses including ice growth, pH change, concentration of the surrounding solutes, and dehydration that often damage their structural integrity and pharmaceutical functions [e.g., release of active pharmaceutical ingredients (APIs)] of liposomes. Retaining water-soluble APIs is a particular challenge for development of liposome formulations.<sup>1</sup> Formulation and process design that are based on an understand-

ing of the freeze-related stresses and required stabilization mechanisms should improve the stability of various liposome pharmaceuticals.<sup>1–3</sup>

Disaccharides (e.g., trehalose and sucrose) and some amino acids have been applied to protect the lipid systems from chemical and physical changes during freeze–thawing (cryoprotectants) and freeze-drying (lyoprotectants).<sup>1,3</sup> The stabilization of liposomes by disaccharides is explained mainly by three mechanisms. Some saccharides substitute the water molecules necessary to retain the supramolecular phospholipid assembly through molecular interactions with hydrophilic phospholipid head groups (water substitution).<sup>5–7</sup> The saccharides also form highly viscous amorphous freeze-concentrated phases and dried solids that prevent direct contact between liposome vesicles (bulking).<sup>1,8,9</sup> The reduced mobility of the surrounding molecules helps improve the chemical and physical stability of liposomes (vitrification). Use of the stabilizers is mostly dependent on empirical trial and error through analysis of the morphological (e.g., size) and functional (e.g., API or marker

Correspondence to: Ken-ichi Izutsu (Telephone: +81-3-3700-1141; Fax: 81-3-3707-6950; E-mail: izutsu@nih.go.jp)

*Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 100, 2935–2944 (2011)  
© 2011 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

retention) traits of the resulting suspensions or dried solids.

Longstanding cryopreservation studies of living cells and microorganisms provide precepts valuable for the protection of liposomes against the freeze-induced stresses.<sup>10–14</sup> The cooling of cell and liposome suspensions induces the freezing of bulk solutions initiated by heterogeneous ice nucleation at the surface of containers or impurities ( $-5^{\circ}\text{C}$  to  $-25^{\circ}\text{C}$ ) and the freezing of spatially restricted internal solutions initiated by homogeneous (spontaneous) ice nucleation ( $-25^{\circ}\text{C}$  to  $-45^{\circ}\text{C}$ ).<sup>15–21</sup> The bulk solution freezing and the accompanying significant concentration of solutes surrounding the living cells and liposomes induce osmotic stress that removes the internal solution before they freeze, leading to morphological changes observable by microscopic methods (e.g., optical microscope and cryo-transmission electron microscopy).<sup>21,22</sup> Because the intracellular ice formation (IIF) is widely recognized to cause lethal damage through disordering of the complex membrane and intracellular structure (e.g., organelle), cryopreservation of the living cells and microorganisms is usually performed in two ways that prevent IIF, namely by slow cooling of suspensions containing extracellular solutes (cell dehydration) and by rapid cooling of the suspensions containing high-concentration membrane-permeating solutes [e.g., dimethyl sulfoxide (DMSO), cytoplasm vitrification].<sup>12</sup> On the contrary, only limited studies have been performed on the stabilization of liposomes taking various freezing-related physical changes into account.<sup>17,23–25</sup>

The purpose of this study was to elucidate the effect of intra- and extraliposomal trehalose on the freeze-related physical changes and functional stability of liposomes during freeze–thawing. The effect of saccharide distribution across the membrane on the stability of liposomes is of particular interest for formulation purposes because the liposome preparation methods significantly affect allocation of the nonpermeating solutes. Different solute concentrations across the membrane induce osmotic flow that shrinks or swells the liposomes in the aqueous suspensions.<sup>4,22,26</sup> Literature claims the requirement of disaccharides on both sides of the membrane to protect liposomes from freezing- and lyophilization-related stresses (e.g., addition before extrusion).<sup>8</sup> Recent reports suggested that the rational setting of different intra- and extraliposomal trehalose concentrations confers better stabilization.<sup>1,27</sup> Effect of trehalose on the freeze-related physical phenomena (e.g., freeze-induced dehydration and intraliposomal solution freezing) and functional stability of liposomes were studied mainly through thermal analysis and through the retention of encapsulated carboxyfluorescein (CF).<sup>27,17</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Chemicals obtained from the following sources were used without further purification: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) (NOF Co., Tokyo, Japan); trehalose dihydrate, glucose, sucrose, and 5(6)-CF (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, Missouri); DMSO, xylitol, and glycerol (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan); and dextran 4000–6000 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).

### Preparation of Liposome Suspensions

Phospholipid films were obtained by drying their solution in a chloroform and methanol mixture (2:1) under vacuum at temperatures above the main transition temperature ( $T_m$ ). Liposome suspensions were prepared by using a hand-held extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama). The films hydrated by 10 mM Tris–HCl buffer (6%, w/w; pH 7.4) were extruded 12 times through a polycarbonate membrane filter (0.1–0.8  $\mu\text{m}$  pore, 0.2  $\mu\text{m}$  unless otherwise mentioned; Whatman, Maidstone, UK) while maintaining the apparatus at room temperature (POPC) or at temperatures 10 to 15 $^{\circ}\text{C}$  higher than the  $T_m$  of the respective lipids. The DPPC liposomes extruded through the smaller pore membranes (0.1 and 0.2  $\mu\text{m}$ ) were reported to have a unilamellar structure, whereas those extruded through the larger pore membranes (0.4 and 0.8  $\mu\text{m}$ ) contained increasing ratios of multilamellar vesicles.<sup>29,30</sup> The term “0.2  $\mu\text{m}$  liposome” will be used in the text given below to denote samples prepared by extrusion through the respective pore size membranes.

Some liposome suspensions containing the excipients predominantly in the extraliposomal media were prepared by adding the excipients approximately 30 min prior to the thermal analysis and freeze–thawing experiments. Those containing excipients in both the inside and outside of the membranes were prepared by the extrusion of lipids hydrated with the excipient-containing solutions. Some suspensions were eluted through Sephadex G-25 desalting columns (PD-10; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) equilibrated with the Tris–HCl buffer to obtain samples containing the excipient mainly in the intraliposomal solutions. The concentrations of DPPC in the column-eluted suspensions were obtained by phosphorous assay.<sup>31</sup> Measurement of the DPPC concentrations in the liposome suspensions indicated that approximately 90% of the liposomes passed through the Sephadex columns.

### Thermal Analysis

Thermal analysis of the frozen liposome suspensions was performed by using a differential scanning calorimeter (DSC Q10; TA Instruments, New Castle, Delaware) equipped with a refrigerating system and data processing software (Universal Analysis 2000, TA Instruments). Aliquots [10  $\mu$ L, 4% (w/w) lipid] of suspensions in hermetic aluminum cells were cooled from 25°C to -70°C at varied speeds (1–10°C/min) and then heated to 25°C at a scanning rate of 5°C/min. The intensity of the intraliposomal solution freezing exotherm was shown as their ratio to the lipid content (J/g lipid). Some DPPC liposome suspensions were heat-treated at 45°C for 3 min before the cooling scan. The cooling scan of some suspensions were paused at certain temperatures (-10°C to -35°C) and maintained those temperatures for 30 or 60 min before further cooling to study the effect of low temperature storage on the physical changes. The column-eluted liposome suspensions were subjected to thermal analysis without the concentration adjustment. The homogeneous ice formation exotherms of these suspensions were calculated using the phosphate concentration data.

### Measurement of Liposome Size by Dynamic Light Scattering

The size distribution of liposomes suspended in the Tris-HCl buffer (0.08% DPPC, 25°C) was determined using a dynamic light scattering (DLS) spectrophotometer (Photal DLS-7100SL; Otsuka Electronics Co., Osaka, Japan) with a He-Ne laser (632.8 nm) and a scattering angle (90°; 50 scans).

### CF Retention Study

Dried DPPC films were hydrated with solutions containing 25 mM 5(6)-CF, 10 mM Tris-HCl buffer, and 0% or 12% trehalose, adjusted to pH 7.4 by NaOH. The CF-loaded vortexed multilamellar liposome suspensions (6% lipid, w/w) were prepared by extrusion through a 0.2- $\mu$ m pore filter, and then eluted through the Sephadex G-25 column equilibrated with the buffer or trehalose-containing buffer. Freeze-thawing of the suspension was performed using the DSC system while the thermal profiles were simultaneously monitored. Aliquots of the liposome suspensions (10  $\mu$ L, 4% DPPC, w/w) in unsealed aluminum pans were cooled to -35°C or -70°C at varied cooling speeds (1–10°C/min), and then heated to 25°C at 10°C/min on the DSC furnace. The freeze-thawed liposome suspensions were diluted by adding the Tris-HCl buffer or trehalose-containing buffer solutions (10 mL) in the glass tubes. The mildly agitated liposome suspensions underwent fluorescence measurement using a spectrometer (FP-6500; JASCO

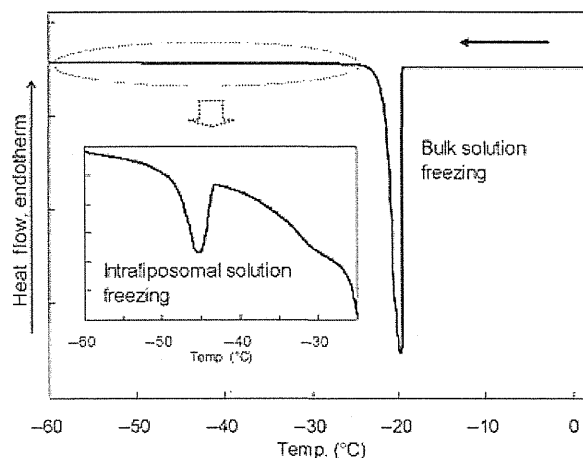
Corp., Tokyo, Japan). After the initial fluorescence measurements of the suspensions (2 mL) at 460 nm (excitation) and 550 nm (emission), those of the membrane-perturbed liposome suspensions were obtained by the addition of aliquots (20  $\mu$ L) of Triton X-100. The CF leakage ratio was calculated using the following equation:

$$\begin{aligned} \% \text{ Leakage} = & \\ & \frac{\text{Initial fluorescence of treated sample} \\ & - \text{initial fluorescence of control}}{(\text{Final fluorescence of treated sample} \\ & - \text{initial fluorescence of control})} \\ & \times 100 \end{aligned}$$

## RESULTS AND DISCUSSION

### Freeze-Induced Changes in Liposome Suspensions

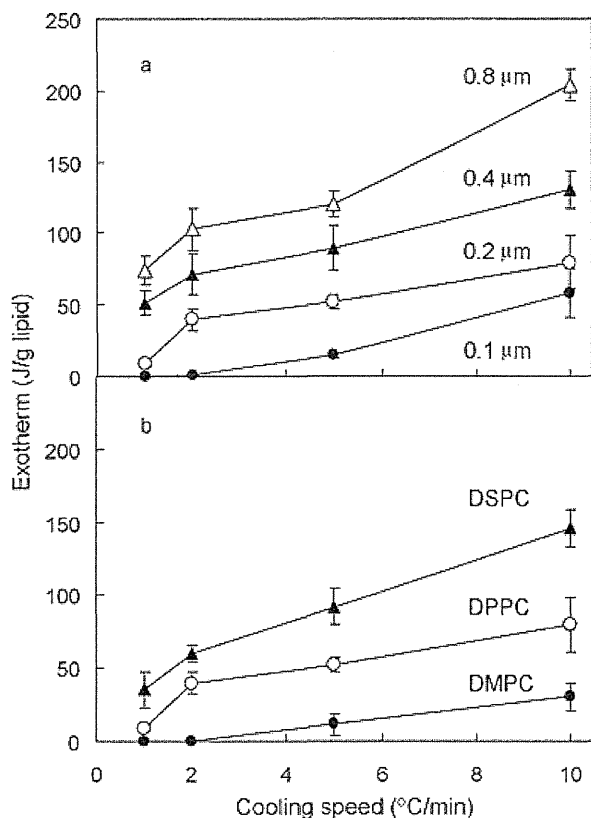
Figure 1 shows a thermogram of a frozen DPPC liposome suspension (4% in 10 mM Tris-HCl buffer, 0.2  $\mu$ m) cooled at 5°C/min. The suspension showed a large exothermic peak of the freezing of the bulk solution (heterogeneous ice nucleation) at approximately -20°C and a smaller second exothermic peak of the freezing of the intraliposomal solution (homogeneous ice nucleation) at approximately -45°C.<sup>15,17,32</sup> The lower temperature exotherm disappeared by prior addition of a membrane-perturbing surfactant (1% Triton X-100), which supported the aforementioned definition of the peak rather than other interpretations (e.g., freezing of phosphatidylcholine headgroups) of the exotherm (data not shown).<sup>33</sup> The temperature



**Figure 1.** Cooling thermogram of a frozen DPPC liposome suspension. An aliquot (10  $\mu$ L) of liposome suspension (4% lipid, w/w) in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4) was cooled from room temperature to -70°C at 5°C/min.

of the bulk solution freezing peak varied greatly between the scans. Some suspensions also showed a broad exotherm at approximately  $-30^{\circ}\text{C}$ . The exotherm suggested the freezing of solutions released from the liposomes (dehydration) and/or freezing of the internal solutions initiated by external ice crystals that penetrated through the membrane.<sup>12,16,34</sup> The varied shape and overlapping of the peak with the large bulk solution freezing exotherm made further characterization difficult in this study. The frozen liposome suspensions showed only a gradual shift of the thermogram before the large ice melting endotherm during their heating scans (data not shown). DLS measurement of the DPPC liposome suspensions indicated a mean diameter of  $203.9 \pm 10.6$  nm before the thermal analysis (three different preparations). Standard deviation of the liposome size obtained in each measurement was within 5% of the average value.

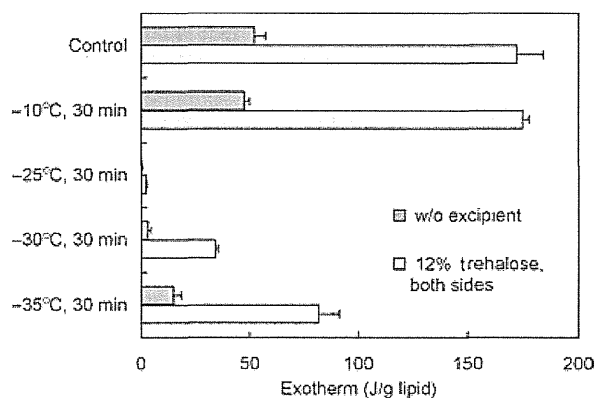
The effects of cooling speeds on the internal solution freezing exotherm of liposomes differing in size and lipid composition are shown in Figure 2. Slower



**Figure 2.** Effects of cooling speed on internal solution freezing exotherm of liposome suspensions with differing (a) extrusion membrane pore sizes (DPPC; 0.1  $\mu\text{m}$ :  $\bullet$ , 0.2  $\mu\text{m}$ :  $\circ$ , 0.4  $\mu\text{m}$ :  $\blacktriangle$ , and 0.8  $\mu\text{m}$ :  $\triangle$ ) and (b) lipid compositions (0.2  $\mu\text{m}$ ; DMPC:  $\bullet$ , DPPC:  $\circ$ , and DSPC:  $\blacktriangle$ ). Aliquots of liposome suspensions (10  $\mu\text{L}$ , 4% lipid in 10 mM Tris-HCl buffer) were cooled at 1–10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (average  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

cooling of the DPPC liposome suspension (0.2  $\mu\text{m}$ ) reduced the exotherm, indicating loss of the supercooled intraliposomal solution during the scan (Fig. 2a; 1–2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). The extraliposomal ice growth and concomitant concentration of solutes should generate osmotic forces that induce water evacuation from liposomes. Reported freeze-induced morphological rearrangement into multilamellar liposomes may also reduce the intraliposomal solution content.<sup>4</sup> The width of the bulk solution freezing peak got narrower in the slower cooling, suggesting a certain time required for the ice growth (data not shown). On the contrary, the limited effect of the cooling speed on the peak width of the intraliposomal solution freezing exotherm suggested independent ice formation in the individual liposomes. A certain amount of the intraliposomal solution interacting (hydrating) with the membrane lipid and/or solute molecules should remain unfrozen even below the intraliposomal solution freezing temperature.<sup>11,11</sup>

Reduction of the intraliposomal solution freezing exotherm was more apparent in the DPPC liposome suspensions temporarily (30 min) kept at temperatures between the bulk and the intraliposomal solution freezing during the cooling scan (Fig. 3). The finding that the intraliposomal solution freezing exotherm of a suspension held at  $-25^{\circ}\text{C}$  was smaller than those of suspensions held at  $-30^{\circ}\text{C}$  or  $-35^{\circ}\text{C}$  suggested faster loss of the supercooled solutions in the temperature range just below the bulk solution freezing. Longer exposure to the temperature range should be one of the reasons for the reduction in the exotherms with the slower cooling. On the contrary, holding the suspension at a temperature above the bulk solution freezing temperature showed no apparent effect on the intraliposomal solution freezing



**Figure 3.** Effect of low temperature holding on internal solution freezing exotherms of DPPC liposome suspensions containing trehalose (0% or 12%, w/w) on both sides of the membrane (10  $\mu\text{L}$ , 4% lipid in Tris-HCl buffer, 0.2  $\mu\text{m}$ ). The suspensions were held at different temperatures ( $-10^{\circ}\text{C}$  to  $-35^{\circ}\text{C}$ ) for 30 min during cooling scans at 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .