

2014/5028A

---

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等実用化研究事業

抗菌活性・創修復作用を有する新規ペプチドを用いた  
遺伝的早老症患者の難治性潰瘍治療薬の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

---

研究代表者 中神 啓徳

平成27(2015)年 3月



---

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等実用化研究事業

抗菌活性・創修復作用を有する新規ペプチドを用いた  
遺伝的早老症患者の難治性潰瘍治療薬の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

---

研究代表者 中神 啓徳  
平成27（2015）年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

抗菌活性・創修復作用を有する新規ペプチドを用いた遺伝的早老症患者の難治性潰瘍治療薬の開発 中神 啓徳	1
---	---

## II. 分担研究報告

1. 医師主導臨床試験に向けた非臨床試験および治験薬製造 富岡 英樹・渡辺 元・中神 啓徳	4
2. 健常人を対象とした皮膚刺激性試験及び次相の臨床治験の準備 楽木 宏実・横手 幸太郎・三木 哲郎・中神 啓徳	7

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
---------------------	----

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 抗菌活性・創修復作用を有する新規ペプチドを用いた遺伝的早老症患者の難治性潰瘍治療薬の開発

研究代表者 中神 啓徳 大阪大学大学院連合小児発達学研究所 寄附講座教授

## [研究要旨]

新規ペプチドSR-0379は難治性皮膚潰瘍治療を目指した外用薬開発を目指す薬剤である。SR-0379は血管新生促進作用等による創傷治癒効果と膜透過性変化による抗菌作用を併せ持ち、ラット創傷モデルでフィブラストスプレーと同等あるいはそれ以上の創修復効果を認めている。ウエルナー症候群に多く合併する慢性皮膚潰瘍への適応が目標とし、将来的には糖尿病性潰瘍・褥瘡などへの適応の拡大を視野に入れる。今年度は、非臨床試験として循環器系安全性薬理試験非臨床試験を遂行し、並行して健常人を対象とした皮膚刺激性試験を行った。安全性薬理試験では特に異常所見を認めなかった。ヒト臨床試験に向けて、治験薬GMPでの原薬・製剤化を行い、SR-0379 0%, 0.02%, 0.1%, 0.25%, 0.5%のスプレー製剤の製造を終了した。また、PMDAとの事前面談で治験体制の確認を行った後、外部フェーズI施設に委託して皮膚刺激性試験を計画し、審査評価委員会での承認後に治験届を提出した。PMDAへの回答終了後に11月に健常人20名に対してパッチテスト（48時間 closed patch test）を施行した。塗布部位の軽度（±）な紅班が散見されたが、局所部位をはじめバイタルサイン、臨床検査値、心電図検査においても特段の問題となる所見は見られなかった。翌年以降の患者での臨床試験に向けて、薬事戦略相談・事前面談を行い、実施計画書などの作成を行った。

## 分担研究者

楽木 宏実	大阪大学大学院医学系研究科・教授
富岡 英樹	アンジェスMG・研究員
渡辺 元	アンジェスMG・研究員
横手幸太郎	千葉大学大学院医学研究科・教授
三木 哲郎	京都大学大学院医学系研究科・特任教授

特に QOL の改善から新しい治療法が求められている。

我々が同定した新規抗菌性ペプチド AG30 を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発は、早期探索型臨床試験拠点のシーズとし選定されたことを契機に、医師主導型治験あるいは将来的な企業への導出を念頭におき改変体を作成し、AG30/5C ペプチドが血清によって分解される代謝産物の機能解析から、20 残基のアミノ酸で一部 D 体にアミノ酸を置換した低コストで活性のあるペプチドの作成に成功した（SR ペプチド）。このペプチドを用いた同疾患への医師主導型治験を計画している。

## A. 研究目的

創に対する治療法として、創傷治癒を促進するための湿潤環境を作る湿潤療法が提唱されている。他方、創部では皮膚のバリアー機構が破綻しているために種々の細菌が繁殖することが多く、創の治りに関与しない汚染あるいは繁殖（コロニゼーション）の状態か、又は創の治癒を遅延させる感染の状態かを正確に見極めて、適切な治療を行うことが重要とされる。

難治性皮膚潰瘍では局所感染兆候（発熱・発赤・腫脹・疼痛）の判定が困難なことが多く、その感染に至る前段階（クリティカルコロニゼーション）での見極めが難しい。特にウエルナー患者での皮膚潰瘍は圧のかかる部位に好発するため創傷被覆材が用いられることが多い。難治性潰瘍患者では

## B. 研究方法

医師主導治験に向けた非臨床試験を進める。すずで、ラット全層欠損モデルでの創傷治癒促進作用、各種細菌に対する抗菌活性、CMC（原薬の分析・安定性）、薬物動態試験（LC/MS）、ウサギ皮膚一次刺激性試験、遺伝毒性試験（非 GLP）、ラット 2 週間反復毒性試験（非 GLP）、毒性試験（ラット 4 週間反復毒性試験）、安全性薬理試験（中枢神経・呼吸）、刺激性・感作性試験（ウサギ皮膚累積刺激性試験、モルモット皮膚感作性試験）が終了しており、平成 26 年度はサルでの安全性薬理試験（循環系）を遂行した。

CMC は治験薬 GMP での原薬・製剤の予備検討が終了しており、平成 26 年度は治験薬の原薬製造・製剤化を行った。また、SR-0379 の作用メカニズムの検討として細胞内情報伝達系の解析も行なった。臨床試験に向けた書類整備（手順書・治験薬概要書・実施計画書・症例報告書・患者説明文書）を進め、治験審査評価委員での承認、PMDA への治験届提出後に健常人 20 名に対するパッチテストを行った。

#### （倫理面への配慮）

すべての基礎研究は事前に動物実験プロトコールなどが大阪大学大学院医学系研究科で承認された上で遂行した。

本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施する。

- ・ 「動物の愛護および管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）
- ・ 「研究機関などにおける動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年度厚生労働省告示第 71 号）

非臨床試験は、非臨床試験は薬事法の「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」に則り GLP 基準で遂行する。

医師主導治験は、「医薬品の臨床試験の実施に関する基準（Good Clinical Practice: GCP）」に準拠し、適切な説明に基づく被験者の同意の確保、及び被験者の人権保護に配慮することにより実施される。臨床試験は改正薬事法に従い施行する。また、実施医療機関の治験審査委員会の審査、承認を経て、自ら治験を実施しようとする者から厚生労働大臣宛てに治験計画届書が提出される。

#### C. 研究結果

医師主導治験に必要な非臨床試験としてサルを用いた循環器系の安全性薬理試験を行ったが、特に問題を認めなかった。上記試験をもって、PMDA 薬事戦略相談対面助言で確認した患者での初期評価試験に必要な非臨床試験をすべて実施終了したため、患者への投与の臨床治験の開始が可能となった。CMC としては、前年度に施行した予備検討を元にして、治験薬 GMP で American Peptide で治験薬の合成を行い、その後ナガセ医薬品で製剤化を行い、第 1 相および第 1/2a 相に必要な製剤合成を終了した。

また、SR-0379 の細胞内情報伝達系の解析も並行して行い、ヒト線維芽細胞でインテグリンのノックダウンにより SR-0379 の細胞内情報伝達系活性

化が阻害されることが分かり、SR-0379 の創修復作用のメカニズムが明らかとなった。

臨床試験に関しては、第 1 相試験として健常人 20 名を対象とした皮膚刺激性試験（パッチテスト）を信濃坂クリニックに委託して行った。結果、特に刺激性を認めず次相の患者への試験へと進むこととなった。第 1/2a 相に関しては、PMDA 薬事戦略相談を 12 月に行い、3 月に対面助言を実施して試験デザインを決定した。次年度の患者での臨床試験に向けた準備として、分担研究者の横手教授を中心にウエルナー症候群の患者会で本研究の取り組みを紹介し、患者への情報提供を積極的に行なった。

#### D. 考察

医師主導治験として、自ら開発した化合物を原薬・製剤化から取り組んでおり、治験薬 GMP としての書類整備後に初期評価試験までの治験薬の製造を完了した。また、非臨床試験に関しても PMDA での対面助言で充足性を確認した試験を終了することができた。臨床試験においても、健常人での皮膚刺激性試験（パッチテスト）を終了した。次年度以降で患者での臨床治験を開始する予定である。

#### E. 結論

老年症に合併する難治性皮膚潰瘍の新規治療薬開発を目指して、非臨床試験・CMC・臨床試験（健常人に対するパッチテスト）を終了した。今後、皮膚潰瘍患者での評価へと進む予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

Tomioka H, Nakagami H, Tenma A, Saito Y, Kaga T, Kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R. Novel Anti-Microbial peptide, SR-0379, Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway. PLOS ONE 2014;9:e92597.

Tomioka H, Nakagami H, Sano T, Takafuji K, Takashima S, Kaneda Y, and Morishita R, Development of LC-MS/MS quantification of the novel antimicrobial peptide, SR-0379, and its pharmacokinetics in rats.

## 2. 学会発表

Hironori Nakagami 「A Novel Anti-microbial Peptide, SR-0379, Accelerated Wound Healing; Toward Clinical Application」 The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014.4.14、京都<シンポジウム>

中神 啓徳 「新規抗菌性ペプチドの同定・改良による難治性皮膚潰瘍外用薬の開発」第11回DIA日本年会、2014.11.17、東京<シンポジウム>

中神 啓徳 「新規機能性ペプチドの発見から臨床開発に向けて」メディカルジャパン 2015 大阪、2015.2.4、大阪<口演>

中神 啓徳 「皮膚潰瘍治療薬の開発研究への道程」第2回ヤング・サイエンティスト・シンポジウム、2015.1.24、東京<口演>

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 名称：血管新生誘導剤及びそれに用いられるポリペプチド

出願番号：特願 2007-29945

出願日：平成19年2月9日

PCT JP2008/052022

発明者：中神啓徳、西川智之、金田安史、森下竜一、前田明人、田村奈緒

2) 名称：新規ポリペプチドおよびそれを有効成分

として含有する抗菌剤

出願番号：特願 2007-29920

出願日：平成19年2月9日

PCT JP2008/052020

発明者：中神啓徳、西川智之、金田安史、朝野和典、前田明人、田村奈緒

出願人：大阪大学およびジェノメディア（株）

3) 名称：血管内皮細胞増殖促進遺伝子

出願番号：特願2004-081688

出願日：平成16年3月19日、

PCT/JP2005/004832

発明者：西川智之、中神啓徳、金田安史

出願日：2000年10月5日

医師主導臨床治験に向けた非臨床試験および治験薬製造

研究分担者

富岡 英樹 アンジェスMG株式会社  
渡辺 元 アンジェスMG株式会社  
中神 啓徳 大阪大学大学院連合小児発達学研究所 寄附講座教授

**[研究要旨]**

新規ペプチド SR-0379 は血管新生促進作用等による創傷治癒効果と膜透過性変化による抗菌作用を併せ持ち、難治性皮膚潰瘍治療を目指した外用薬開発を目指す薬剤である。非臨床試験として、ラット全層欠損モデルでの創傷治癒促進作用、各種細菌に対する抗菌活性、CMC（原薬の分析・安定性）、薬物動態試験(LC/MS/MS)、ウサギ皮膚一次刺激性試験、ウサギ眼刺激性試験、遺伝毒性試験（非 GLP）、ラット 2 週間反復毒性試験（非 GLP）、毒性試験（ラット 4 週間反復毒性試験）、安全性薬理試験（中枢神経・呼吸）、刺激性・感作性試験（ウサギ皮膚累積刺激性試験、モルモット皮膚感作性試験）、サル 1 週間反復毒性試験（非 GLP）が終了しており、平成 26 年度はサルでの安全性薬理試験（循環系）を遂行し、翌年の試験での血中濃度測定のためのバリデーションを行った。CMC は治験薬 GMP での原薬・製剤の予備検討が終了しており、平成 26 年度は治験薬の原薬製造・製剤化を行った。SR-0379 の作用メカニズムの検討としてヒト繊維芽細胞を用いた細胞内情報伝達系の解析も行なった。

**A. 研究目的**

我々が同定した新規抗菌性ペプチド AG30 を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発は、医師主導型治験あるいは将来的な企業への導出を念頭におき改変体を作成し、AG30/5C ペプチドが血清によって分解される代謝産物の機能解析から、20 残基のアミノ酸で一部 D 体にアミノ酸を置換した低コストで活性のあるペプチドの作成に成功した（SR ペプチド）。このペプチドを用いた同疾患への医師主導型治験を計画している。

臨床試験を遂行するために必要な非臨床試験および製剤化検討を行うことを目的とする。

**B. 研究方法**

SR-0379の非臨床試験としてサルを用いた安全性薬理試験（心血管系）を行った。治験薬GMPでの原薬合成および製剤化の予備検討を行った。

また、SR-0379の作用メカニズムの解析として、ヒト皮膚培養線維芽細胞を用いて細胞内情報伝達系を解析・検討した。

まずは1ヶ月間の保存安定性を確認し、その後も長期安定性を確認する。次相のヒトでの薬物血中濃度測定のためにヒト血清でのバリデーション

ンを行う。

**（倫理面への配慮）**

1）本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施した。

・「動物の愛護および管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）

・「研究機関などにおける動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年度厚生労働省告示第 71 号）

また本研究の動物実験は、その動物実験プロトコールが大阪大学大学院医学系研究科で承認後に施行されている。

2）臨床研究計画は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（厚生省令第 21 号、平成 9 年 3 月 26 日、一部改正 厚生労働省令第 114 号 平成 20 年 6 月 13 日）、医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイドライン平成 10 年 11 月 13 日医薬審第 1019 号医薬安全局審査管理課長通知（改正平成 22 年 2 月 19 日 0219 号第 4 号）

を順守して進める。

### C. 研究結果

安全性薬理試験では、雄 4 例のカニクイザルに生理食塩液に溶解した SR-0379 を 1、3 及び 10 mg/kg の投与量で皮下投与し、無麻酔、非拘束下で血圧（収縮期、拡張期及び平均血圧）、心拍数及び心電図をテレメトリー法で評価した。投与は、6 日間の休薬期間をおき、低用量から順次漸増投与した。血圧、心拍数及び心電図パラメータにおいて、全ての用量で SR-0379 投与の影響は認められなかった。行動観察ないし一般状態観察において、全ての用量で SR-0379 の影響は認められなかった。以上の結果から、SR-0379 は 10 mg/kg 以下の投与量で心血管系に対する影響はないと考えられた。

また、SR-0379 の細胞内情報伝達系の解析も並行して行い、ヒト線維芽細胞でインテグリンのノックダウンにより SR-0379 の細胞内情報伝達系活性化が阻害されることが分かり、SR-0379 の創修復作用のメカニズムが明らかとなった。

CMC に関しては、治験薬製造に向けた書類整備を進めた上で 4 月から American Peptide Company で治験薬 GMP でのペプチド合成を開始し、出荷試験を行った後に、9 月にナガセ医薬品で製剤化を行った。11 月の皮膚刺激性試験に用いるために、出荷試験・判定を行い信濃坂クリニックへ搬送した。並行して、上記の皮膚刺激性試験前には 1 ヶ月間の保存安定性を確認し、現在も安定性試験を継続中である。安定性試験に必要な標準品の合成、あるいは次相の薬物血中濃度測定のためにヒト血清でのバリデーションを行った。

### D. 考察

SR-0379 は皮膚潰瘍治療薬として外用剤として開発を行っており、これまでの試験で薬効試験での有効性と薬物動態試験で局所治療薬としての特性を見出している。非臨床試験において、安全性薬理試験でも特に異常は認めず、ヒト皮膚潰瘍患者での初期評価試験を行うための非臨床試験は終了し、臨床試験へと進む上で大きな問題は認められなかった。

### E. 結論

治験に向けた治療用ペプチドとして 20 個のアミノ酸からなる新規ペプチド、SR-0379 を合成し、難治性皮膚潰瘍治療の治験に向けた非臨床試験が概ね終了した。

### F. 研究発表

Tomioka H, Nakagami H, Tenma A, Saito Y, Kaga T,

kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R. Novel Anti-Microbial peptide, SR-0379, Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway. PLOS ONE 2014;9:e92597.

Tomioka H, Nakagami H, Sano T, Takafuji K, Takashima S, Kaneda Y, and Morishita R, Development of LC-MS/MS quantification of the novel antimicrobial peptide, SR-0379, and its pharmacokinetics in rats. *Immun, Endoc. & Metab. Agents in Med.* 2014;14:26-31

### 2. 学会発表

Hironori Nakagami 「A Novel Anti-microbial Peptide, SR-0379, Accelerated Wound Healing; Toward Clinical Application」The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4. 14, 京都〈シンポジウム〉

中神 啓徳 「新規抗菌性ペプチドの同定・改良による難治性皮膚潰瘍外用薬の開発」第 11 回 DIA 日本年会, 2014. 11. 17, 東京〈シンポジウム〉

中神 啓徳 「新規機能性ペプチドの発見から臨床開発に向けて」メディカルジャパン 2015 大阪, 2015. 2. 4, 大阪〈口演〉

中神 啓徳 「皮膚潰瘍治療薬の開発研究への道程」第 2 回ヤング・サイエンティスト・シンポジウム, 2015. 1. 24, 東京〈口演〉

### G. 知的財産権の出願・登録状況

1) 名称：血管新生誘導剤及びそれに用いられるポリペプチド

出願番号：特願 2007-29945

出願日：平成 19 年 2 月 9 日

PCT JP2008/052022

発明者：中神啓徳、西川智之、金田安史、森下竜一、前田明人、田村奈緒

2) 名称：新規ポリペプチドおよびそれを有効成分

として含有する抗菌剤

出願番号：特願 2007-29920

出願日：平成 19 年 2 月 9 日

PCT JP2008/052020

発明者：中神啓徳、西川智之、金田安史、朝野和典、前田明人、田村奈緒

出願人：大阪大学およびジェノメディア（株）

3) 名称：血管内皮細胞増殖促進遺伝子



出願番号：特願2004-081688  
出願日：平成16年3月19日、  
PCT/JP2005/004832

発明者：西川智之、中神啓徳、金田安史  
出願日：2000年10月5日

健常人を対象とした皮膚刺激性試験及び次相の臨床試験の準備

研究分担者

楽木 宏実 大阪大学大学院医学系研究科・教授  
横手 幸太郎 千葉大学大学院医学研究科・教授  
三木 哲郎 京都大学大学院医学系研究科・特任教授  
中神 啓徳 大阪大学大学院連合小児発達学研究科・寄附講座教授

[研究要旨]

新規ペプチド SR-0379 は血管新生促進作用等による創傷治癒効果と膜透過性変化による抗菌作用を併せ持ち、難治性皮膚潰瘍治療を目指した外用薬開発を目指す薬剤である。初期評価試験を行うために必要な非臨床試験、治験薬 GMP での製剤合成が終了したので、平成 26 年は日本人健康成人男性 20 例を対象とし、SR-0379 液(0%、0.02%、0.1%、0.25%、0.5%)の皮膚刺激性及び安全性をパッチテスト(48 時間 closed patch test)により検討した。塗布部位の軽度(±)な紅班が、0% (生理食塩水)の除去後 1 時間で 2 例、除去後 24 時間で 1 例、SR-0379 の 0.02% で各々 1 例、0 例、SR-0379 の 0.25% で各々 2 例、1 例、SR-0379 の 0.5% で各々 3 例、1 例に見られたが、いずれも問題なしと判定された。20 例中 1 例に 1 件「右肩痛、PT: 筋骨格痛、SOC: 筋骨格系及び結合組織障害」が見られたが、因果関係はなしと判定された。発現時期は貼付剥離時(塗布 48 時間後)で 5 日後には回復していた。本有害事象の重篤性は非重篤、程度は軽度、処置の有無は無であった。その他、SR-0379 液の 0.02~0.5%の塗布は、局所部位をはじめバイタルサイン、臨床検査値、心電図検査においても特段の問題となる所見は見られなかった。また、先行していた AG30/5C の皮膚潰瘍患者に対する臨床研究も 2 例に対して投与を行い、探索的な結果を得た。次相の皮膚潰瘍患者での臨床試験を計画し、PMDA 薬事戦略相談の事前面談および対面助言を実施して、実施計画書、患者説明文書、症例報告書などの書類作成を行った。

A. 研究目的

血管新生作用と抗菌活性を併せ持つ新規ペプチド SR-0379 を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発に向けて、第 1 相臨床試験として皮膚刺激性試験(パッチテスト)を行う。

B. 研究方法

SR ペプチドを用いた臨床試験として、平成 26 年度に健康人を用いたパッチテスト(フェーズ I)を行った。先行して行っていた AG30/5C の臨床研究も 2 例の皮膚潰瘍患者に対して投与を行った。次年度に患者の皮膚潰瘍の試験を予定する。

(倫理面への配慮)

医師主導治験は、「医薬品の臨床試験の実施に関する基準 (Good Clinical Practice: GCP)」に準拠し、適切な説明に基づく被験者の同意の確保、及び被験者の人権保護に配慮することにより実施され

る。臨床試験は改正薬事法に従い施行する。また、実施医療機関の治験審査委員会の審査、承認を経て、自ら治験を実施しようとする者から厚生労働大臣宛てに治験計画届書が提出される。

C. 研究結果

日本人健康成人男性 20 例を対象とし、SR-0379 液(0% (生理食塩水)、0.02%、0.1%、0.25%、0.5%)の皮膚刺激性及び安全性をパッチテスト(48 時間 closed patch test)により検討した。塗布部位の軽度(±)な紅班が、0% (生理食塩水)の除去後 1 時間で 2 例、除去後 24 時間で 1 例、SR-0379 の 0.02% で各々 1 例、0 例、SR-0379 の 0.25% で各々 2 例、1 例、SR-0379 の 0.5% で各々 3 例、1 例に見られたが、いずれも問題なしと判定された。有害事象は「右肩痛」が 1 例で見られたのみであった。その他の項目に治験薬に関連する以上所見は見られなかった。20 例中 1 例に 1 件「右肩痛、PT: 筋骨格痛、SOC: 筋骨格系及び結合組織障害」が見られたが、因果関係はなしと判定された。発現時期は貼付剥

離時(塗布 48 時間後)で 5 日後には回復していた。本有害事象の重篤性は非重篤、程度は軽度、処置の有無は無であった。その他、SR-0379 液の 0.02 ~0.5%の塗布は、局所部位をはじめバイタルサイン、臨床検査値、心電図検査においても特段の問題となる所見は見られなかった。

先行して行っていた AG30/5C の臨床研究も 2 例の皮膚潰瘍患者に対して投与を行った。安全性評価としては特に因果関係のある有害事象は認めなかった。有効性については潰瘍面積の縮小効果、投与期間中の菌量の減少効果が認められた。しかし、臨床研究に組み込まれた症例数は 2 例と少なく、投与終了後の菌量抑制の持続効果がみられなかったことから、今後、より多くの患者数を対象とし、より適切な投与期間、投与方法等の検討を行うことが必要と考えられた。

次相の皮膚潰瘍患者での臨床試験を計画し、PMDA 薬事戦略相談の事前面談および対面助言を実施して以下のような試験計画を立案し、実施計画書、患者説明文書、症例報告書などの書類作成を行った。

#### 1. 治験の目的

皮膚潰瘍を対象として SR-0379 液 0% (プラセボ)、0.1%及び 0.5%の臨床的安全性、有効性及び薬物動態の検討を目的とする。

#### 2. 対象疾患

- 1) 糖尿病性潰瘍
- 2) 下腿潰瘍 (虚血性・静脈性)
- 3) 褥瘡

#### 3. 被験者の選択、除外基準

治験薬投与開始時に以下の選択基準をすべて満たし、除外基準に抵触しない者

##### 3. 1. 選択基準

- 1) 20 歳以上 (同意取得時)
- 2) 原則として当該治療及び処置を 2 週間以上継続しても投与対象肢の症状改善が見られない者
- 3) 潰瘍の最大径が 6cm 以下 (30cm<sup>2</sup> 以内) の者
- 4) 入院患者あるいは外来患者

##### 3. 2. 除外基準

- 1) 創部局所に感染を伴い抗生剤治療を必要とする者
- 2) 骨組織まで達する深い潰瘍を有する者
- 3) 悪性腫瘍に起因する潰瘍を有する者
- 4) 悪性腫瘍を合併している者
- 5) 重篤な心不全を有する者
- 6) 重篤な肝疾患、腎疾患、血液疾患等を有する者
- 7) 栄養状態が極度に低下している者 (血清アル

ブミン値が 2g/dL 以下)

- 8) 重篤な細菌感染により全身状態が極度に悪化している者
- 9) 妊娠している女性、授乳中の女性又は同意取得日から治療期終了日まで避妊することに同意が得られない妊娠可能な女性
- 10) 治験薬投与開始前 2 週間以内に皮膚潰瘍治療を目的とした薬効評価に影響を及ぼす薬剤 (PGE<sub>1</sub> 製剤、細胞増殖を促す製剤等) の新たな投与を受けた者
- 11) 治験薬投与開始前 2 週間以内に皮膚潰瘍治療を目的とした外科手術を受けた者
- 12) 治験薬投与開始前 12 週間以内に他の治験に参加した者、あるいは同意取得日から治療期終了日までに参加の予定がある者
- 13) その他、治験責任医師又は治験分担医師が、本治験の対象として不適当と判断した者

#### 4. 治験デザイン

二重盲検比較試験

#### 5. 治験薬

SR-0379 液:1 スプレー (10mL) 中に SR-0379 として 0% (プラセボ)、0.1%、0.5%を含有するスプレー液

#### 6. 治験期間 (投与期間)

投与期間: 原則として 4 週間とする。

#### 7. 投与量及び投与方法

治験薬 1 スプレー (SR-0379 として 0~0.5%) を 1 日 1 回、原則 5 噴霧する。

[投与時の注意事項]

本剤を創部から約 5cm 離して創部全体に 5 噴霧する。

#### 8. 評価項目

##### 8. 1. 有効性評価項目

##### 8. 1. 1. 主要評価項目

- 1) 潰瘍の大きさ (写真撮影による面積の推移)

##### 8. 1. 2. 副次的評価項目

- 1) 潰瘍面積が 25%以上縮小した「改善」度
- 2) DESIGN-R スコア
- 3) 創部培養検査による定性的評価
- 4) 最終評価時の全般改善度

##### 8. 2. 血中薬物濃度

血中薬物濃度の測定

##### 8. 3. 安全性評価項目

- 1) 有害事象及び副作用の発現状況
- 2) バイタルサイン (血圧、脈拍数、体温)

- 3) 臨床検査値（血液学的検査値、血液生化学的検査値、尿検査値）
- 4) 12 誘導心電図
9. 目標症例数  
治験薬投与群として各投与量 3 例（3 用量）、合計で 9 例とする。

#### 9. 治験実施期間

2015 年 10 月～2016 年 9 月（被験者の登録期限は 2016 年 3 月を目処とする）

次年度の患者での臨床試験の結果を踏まえて、ウエルナー症候群の難治性皮膚潰瘍治療の試験を予定している。その準備として、分担研究者の横手教授の厚労省班会議と連携し患者レジストリーを進めるとともに、ウエルナー症候群の患者会で本研究の取り組みを紹介し、患者への情報提供を積極的に行なった。

#### D. 考察

SR-0379 の非臨床試験において、全身毒性は認めず、刺激性試験も陰性であったが、感作性試験（アジュバントと同時に投与したモルモットの感作性試験）でのみ陽性を認めた。健康人を対象とした皮膚刺激性試験では特記すべきことはなかった。

#### E. 結論

早老症に合併する難治性皮膚潰瘍の新規治療薬開発を目指して、臨床試験（健康人に対するパッチテスト）を終了した。今後、皮膚潰瘍患者での評価へと進む予定である。

#### F. 研究発表

Tomioka H, Nakagami H, Tenma A, Saito Y, Kaga T, Kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R. Novel Anti-Microbial peptide, SR-0379, Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway. PLOS ONE 2014;9:e92597.

Tomioka H, Nakagami H, Sano T, Takafuji K, Takashima S, Kaneda Y, and Morishita R, Development of LC-MS/MS quantification of the novel antimicrobial

peptide, SR-0379, and its pharmacokinetics in rats. *Immun, Endoc. & Metab. Agents in Med.* 2014;14:26-31

#### 2. 学会発表

Hironori Nakagami 「A Novel Anti-microbial Peptide, SR-0379, Accelerated Wound Healing; Toward Clinical Application」 The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4. 14、京都<シンポジウム>

中神 啓徳「新規抗菌性ペプチドの同定・改良による難治性皮膚潰瘍外用薬の開発」第 11 回 DIA 日本年会、2014. 11. 17、東京<シンポジウム>

中神 啓徳「新規機能性ペプチドの発見から臨床開発に向けて」メディカルジャパン 2015 大阪、2015. 2. 4、大阪<口演>

中神 啓徳「皮膚潰瘍治療薬の開発研究への道程」第 2 回ヤング・サイエンティスト・シンポジウム、2015. 1. 24、東京<口演>

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 名称：血管新生誘導剤及びそれに用いられるポリペプチド

出願番号：特願 2007-29945

出願日：平成 19 年 2 月 9 日

PCT JP2008/052022

発明者：中神啓徳、西川智之、金田安史、森下竜一、前田明人、田村奈緒

- 2) 名称：新規ポリペプチドおよびそれを有効成分

として含有する抗菌剤

出願番号：特願 2007-29920

出願日：平成 19 年 2 月 9 日

PCT JP2008/052020

発明者：中神啓徳、西川智之、金田安史、朝野和典、前田明人、田村奈緒

出願人：大阪大学およびジェノメディア（株）

- 3) 名称：血管内皮細胞増殖促進遺伝子

出願番号：特願 2004-081688

出願日：平成 16 年 3 月 19 日、

PCT/JP2005/004832

発明者：西川智之、中神啓徳、金田安史

出願日：2000 年 10 月 5 日



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	巻号	ページ	出版年
Nakagami H, Nishikawa T, Tamura N, Maeda A, Hibino H, Mochizuki M, Shimosato T, Moriya T, Morishita R, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y	Modification of a Novel Angiogenic Peptide, AG30, for the Development of Novel Therapeutic Agents.	J Cell Mol Med	16(7)	1629-1639	2012
Tomioka H, Nakagami H, Tennma A, Saito Y, Kaga T, kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R	Novel Anti-Microbial peptide, SR-0379, Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway.	PLOS ONE	9(3)	e92597	2014
Tomioka H, Nakagami H, Sano T, Takafuji K, Takashima S, Kaneda Y, and Morishita R,	Development of LC-MS/MS quantification of the novel antimicrobial peptide, SR-0379, and its pharmacokinetics in rats.	Immun,Endoc.&Metab. Agents in Med.	14	26-31	2014

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

研究成果の刊行物・別刷

# Development of LC-MS/MS Quantification of the Novel Antimicrobial Peptide, SR-0379, and its Pharmacokinetics in Rats

Hideki Tomioka<sup>1,2</sup>, Hironori Nakagami<sup>3\*</sup>, Tomokazu Sano<sup>4</sup>, Kazuaki Takafuji<sup>5</sup>, Seiji Takashima<sup>5</sup>, Yasufumi Kaneda<sup>6</sup> and Ryuichi Morishita<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Gene Therapy, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; <sup>2</sup>AnGes MG, Inc. 7-7-15 Saito Bio-Incubator, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; <sup>3</sup>Division of Vascular Medicine and Epigenetics, Osaka University United Graduate School of Child Development, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; <sup>4</sup>Drug Disposition Research Group, Contract Research Department, ADME & Tox. Research Institute, Sekisui Medical Co., Ltd., 2117 Muramatsu, Tokai, Ibaraki, 319-1182, Japan; <sup>5</sup>Center for Medical Research and Education, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; <sup>6</sup>Division of Gene Therapy Science, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

**Abstract:** During the preclinical study of the original functional peptide, SR-0379, a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was newly developed to study the pharmacokinetics of SR-0379 in rat plasma and subcutaneous tissue samples. Although SR-0379 was unstable in the rat plasma and subcutaneous tissue samples, pretreatment with EDTA and phosphoric acid (4 %) inhibited its degradation. The lower limits of quantification (LLOQ) for SR-0379 were fully validated as 5 ng/ml in plasma and 5 ng/g in tissue with acceptable linearity, intra- and inter-assay precisions, and accuracy. Measurement of SR-0379 concentration in plasma after intravenous injection *via* LC-MS/MS yields plasma concentration-time curves (AUC<sub>0-∞</sub>) with areas of 667 ng•min/ml and an elimination half-life (t<sub>1/2</sub>) of 4.8 min. The concentration of SR-0379 in the subcutaneous tissue samples was 13.1 µg/g tissue at 30 minutes after a single dermal application (1 mg/ml, 50 µl) to a full-thickness excisional wound. Here, a highly sensitive and specific LC-MS/MS assay with a lower limit of quantification of 5 ng/ml was developed and validated to quantify SR-0379 in rat plasma. This method is useful for pharmacokinetic studies of the peptide drugs in rats.

**Keywords:** LC-MS/MS, pharmacokinetics, plasma, quantitation, subcutaneous tissue.

## INTRODUCTION

While screening of the functional genes for angiogenic molecules *via in silico* analysis, we have developed a novel small, angiogenic peptide with thirty amino acids, named as AG30 [1, 2]. From AG30, we further developed a potent angiogenic peptide with anti-microbial activity, named as SR-0379, which has twenty amino acids (under submission). Because both of anti-microbial and angiogenic actions are required in the wound healing process, SR-0379 might be an effective therapeutic agent to treat the wounds such as decubitus ulcer, diabetic ulcer, and burn ulcers.

Recently, functional peptides and proteins have been considered as potential drugs [3-5]. Bioassays, immunoassays and isotope tracer techniques have been used to evaluate the pharmacokinetics of peptides and proteins [6]. Immunoassays such as ELISA are unable to distinguish such compounds from their metabolites, which is the primary disad-

vantage of these methods [7]. The total radioactivity detected using an isotope tracer technique is not indicative of the parent compound concentration in biological samples [8]. Mass spectrometry-based technologies can provide many benefits over these methods [9]. The quantitative analysis of peptides and proteins *via* liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) might be difficult; however, LC/MS methods that utilize a triple quadrupole, ion trap, and quadrupole time-of-flight (Q-ToF) were recently used to quantify peptides [10-12]. Based on these techniques, we have newly developed a sensitive method for determining bioactive peptides in rat plasma and tissues.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

Synthetic SR-0379 was purchased from ILS, Inc. (Tokyo, Japan). An internal standard (purity>99%) containing L-Leucine-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> and <sup>15</sup>N was purchased from Sigma-Aldrich (Hokkaido, Japan) and used without further purification. All organic solvents were of LC/MS grade and were obtained from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan) and Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). HPLC grade water was obtained using a water purification system (Auto pure WR600G, Yamato Scientific Co., Ltd, Tokyo, Japan).

\*Address correspondence to these authors at the Division of Vascular Medicine and Epigenetics, Osaka University United Graduate School of Child Development; Tel/Fax: +81-6-6879-4142; E-mail: nakagami@gts.med.osaka-u.ac.jp and Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamada-oka, Suita, 565-0871, Japan; Tel: +81-6-6879-3406; Fax: +81-6-6879-3409; E-mail: morishit@cgt.med.osaka-u.ac.jp

### LC-MS/MS Analysis

The HPLC system (LC20AD series, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) consisted of a binary pump, autosampler, column oven maintained at 40°C and X Bridge C18 column (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm, Waters, MA, USA). The mobile phase was a mixture of solvent A (0.2% formic acid in Milli-Q water) and solvent B (0.2% formic acid in acetonitrile) and used a flow rate of 0.3 ml/min. The following gradient was used for the plasma analyses: hold at 10% B for 0.2 min, increase linearly to 30% B over 2.6 min, then increase to 90% B over 0.2 min, hold for 1.3 min, decrease to 10% B over 0.1 min, hold for 1 min, increase to 90% B for 0.1 min, hold for 1.2 min, decrease to 10% B for 0.1 min, and hold for 2 min. The following gradient was used for the subcutaneous tissue samples: hold at 10% B for 0.2 min, increase linearly to 30% B over 2.8 min, then increase to 90% B over 0.1 min, hold for 0.5 min, decrease to 10% B for 0.1 min, and hold for 1.8 min.

The detection was performed using a QTRAP5500 mass spectrometer (Applied Biosystems Sciex, Framingham, MA, USA) with an ESI source operating in the positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) of SR-0379 used the m/z 534.1 → 217.2 transition. The following optimized MS conditions were used: curtain gas (nitrogen), gas 1 (air) and gas 2 (air) in portions of 30, 30 and 30, respectively; ion spray voltage of 4500 V; source temperature of 600°C; declustering potentials of 126 V for SR-0379 and 126 V for IS; collision energies of 29 eV (m/z 534 → 217.2) for SR-0379 and 29 eV (m/z 534.4 → 217.2) for IS.

### Optimization of Stability in Plasma

SR-0379 samples (nominal concentrations of 10 and 800 ng/ml) were prepared in blank rat plasma (EDTA). The samples were mixed after adding three times their mass of 4% phosphoric acid. The short-term matrix stability was assessed by analyzing the samples after storing at -80°C, 4°C and room temperature for 24 hours.

### Pretreatment of Plasma Samples

A 5-μL aliquot of a SR-0379 working solution in 50% methanol/H<sub>2</sub>O at various concentrations (5 – 1000 ng/ml) was mixed with 1500 μL phosphoric acid (4%). Next, 495 μL of rat plasma and 10 μL of the internal standard solution (5000 ng/ml) were added. The solution was vortexed for 10 s and centrifuged at 10,000 × g for 5 min. The supernatant was transferred to an Oasis HLB μElution plate that had been previously activated by successive applications of 0.3 ml methanol and 0.3 ml Milli-Q water. This plate was then washed with 0.3 ml of Milli-Q water. The peptide adsorbed onto the surface of the plate was eluted with 150 μL of acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (75:25:1). A 10 μL aliquot was transferred to the LC-MS/MS system.

### Pretreatment of Subcutaneous Tissue Samples

A 5 μL aliquot of a SR-0379 working solution in 50% methanol/H<sub>2</sub>O at various concentrations (5 - 1000 ng/g tissue) was mixed with 750 μL phosphoric acid (4%). Next, 250 μL of a subcutaneous tissue sample (20% homogenate) and 10 μL of an internal standard solution (5000 ng/ml) were

added to the above mixture. The solution was vortexed for 10 s and centrifuged at 10,000 × g for 5 min. The supernatant was transferred to an Oasis HLB μElution plate that had been activated by successive applications of 0.3 ml of methanol and 0.3 ml of Milli-Q water. The plate was then washed with 0.4 ml of Milli-Q water. The adsorbed peptide was eluted on the surface using 150 μL of acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (75:25:1). A 10 μL aliquot was transferred to the LC-MS/MS system.

### Method Validation

The method validation evaluated the specificity, linearity, lower limit of quantitation (LLOQ), precision, accuracy, and extraction recovery. The specificity was evaluated based on whether an interference peak eluted at the same retention time as for the analytes in a blank sample. The calibration curves were constructed over the SR-0379 concentration range from 5 to 1000 ng/ml for plasma and from 5 to 1000 ng/g for tissue. The intra-assay precision and accuracy were evaluated by replicating five QC samples on the same day. The inter-assay precision and accuracy were evaluated by analyzing QC samples across three separate days. The extraction recovery was determined by comparing to a blank plasma or subcutaneous tissue sample containing analytes added after the pretreatment.

### Method Application for a Pharmacokinetic Study in Rats

Male SD rats weighing 250-350 g were used for the following pharmacokinetic studies. SR-0379 (200 μg/kg) was dissolved in saline and administered to the rats *via* a single *i.v.* bolus injection. Blood samples were collected 2, 5, 10, 15 and 30 min after dosing. SR-0379 (1 mg/ml for 50 μL/rat) was transdermally administered throughout the full depth of the rat skin. Blood samples were collected after 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 hours. Subcutaneous tissue samples were collected after 0.5, 1 and 24 hours. The SR-0379 concentrations in both the plasma and subcutaneous tissues were measured *via* LC-MS/MS. The study was discussed and approved by the Ethics Committee.

## RESULTS

### LC-MS/MS Analysis

(Fig. 1A) shows a typical positive ion ESI mass spectrum for SR-0379. The ion peaks at m/z 445.0, 534.1, 667.2 and 889.3 correspond to the 6+, 5+, 4+, 3+ ions, respectively. The 5+ ion showed the highest sensitivity. The product ion spectrum for the 5+ ion is shown in (Fig. 1B). High collision energies were found to yield intense product ions.

Typical SRM chromatograms were obtained using the blank (0 ng/ml) and the lowest calibration standard (5 ng/ml) in rat plasma (Fig. 2). No interfering peaks from endogenous substances were observed at the SR-0379 retention times.

### Optimization of Short-term Stability in Plasma

The short-term stability of SR-0379 in plasma was assessed by analyzing the samples (10 and 800 ng/ml) after storing at -80°C, 4°C, and room temperature for 24 hours. The normal plasma concentrations (nominal concentrations of 10 and 800 ng/ml) were below the limit of quantification



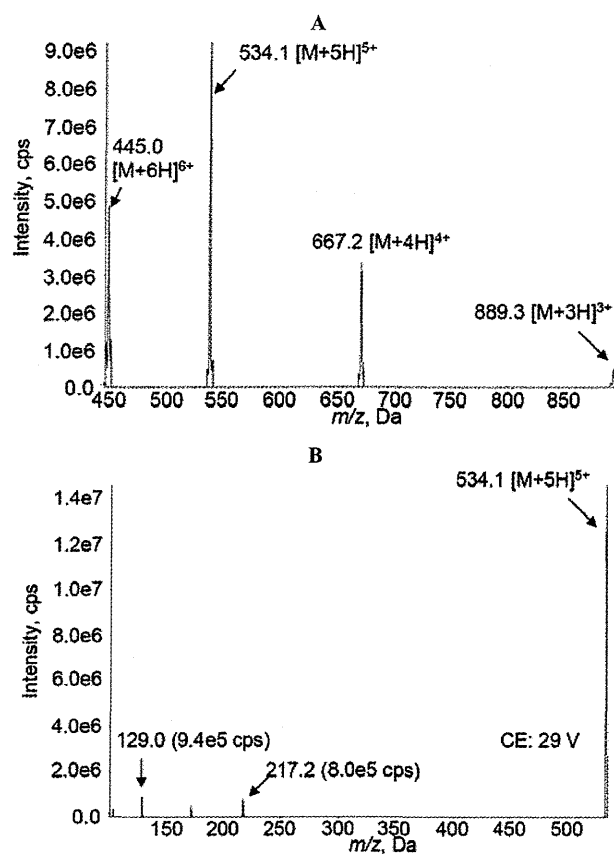


Fig. (1). Positive-ion electrospray mass spectra of SR-0379: (A) precursor ion scan and (B) product ion mass spectra obtained from  $[M + 5H]5+$  ( $m/z$  534.1).

Table 1. Stability of SR-0379 for 24hr on Each Condition

Nominal Concentration (ng/ml)	Conditions		Observed Value (ng/ml)	RR (%)
			Individual	
10	Normal Plasma	RT	No Peak	-
		4°C	2.89	28.9
		-80°C	9.77	97.7
	4%Phosphoric acid/Plasma (3/1, v/v)	RT	7.32	73.2
		4°C	9.37	93.7
		-80°C	10.2	102.0
800	Normal Plasma	RT	31.6	4.0
		4°C	126	15.8
		-80°C	851	106.4
	4%Phosphoric acid/Plasma (3/1, v/v)	RT	733	91.6
		4°C	848	106.0
		-80°C	891	111.4

and equal to 31.6 ng/ml after storing at room temperature (Table 1). Thus, SR-0379 was determined to be unstable in

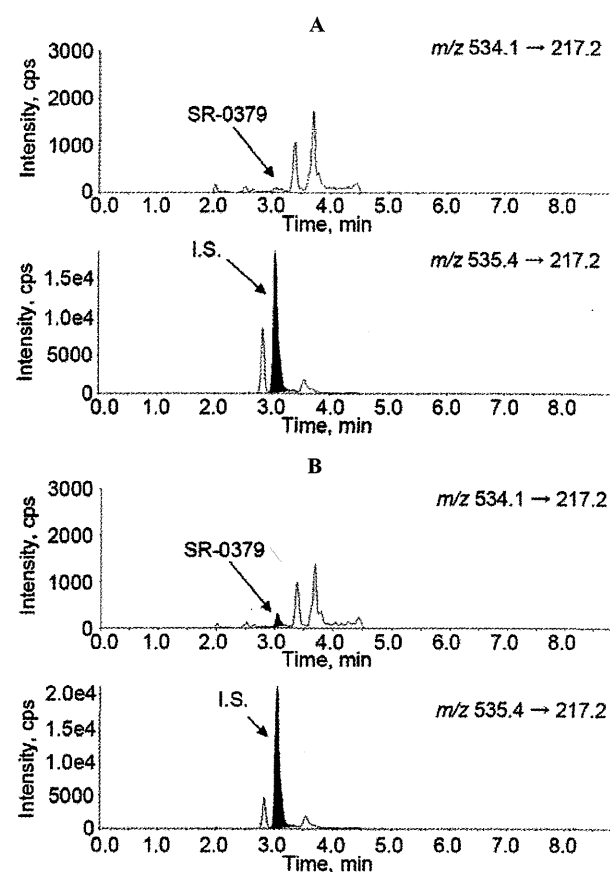


Fig. (2). Selected reaction monitoring ion chromatograms of (A) a rat plasma spiked with an internal standard (500 ng/ml) and (B) rat plasma spiked with both SR-0379 (5 ng/ml) and the internal standard (500 ng/ml). The SRM transitions were  $m/z$  534.1  $\rightarrow$  217.2 for SR-0379 and  $m/z$  535.4  $\rightarrow$  217.2 for the internal standard.

rat plasma. Adding 4% phosphoric acid to the plasma sample stabilized the SR-0379. This method development study demonstrated that LC-MS/MS was sufficiently suitable for detecting SR-0379 in 4% phosphoric acid/plasma (3/1, v/v) to proceed with the method validation.

#### Pretreatment of the Plasma and Subcutaneous Tissue Samples

Solid-phase extraction (SPE) was used as the sample preparation method. During the method development, a variety of SPE cartridges were investigated for both the plasma and subcutaneous tissue sample pre-treatments. Oasis HLB  $\mu$ Elution plates provided the highest recovery amongst the SPE cartridges tested.

#### Method Validation

The specificity was determined by analyzing blank plasma samples from three male rats and three female rats and the pooled plasma of different rats. The assay was linear across the range from 5 to 1000 ng/ml (Table 2). The lower limit of quantification (LLOQ) in rat plasma was determined to be 5 ng/ml. The within-run CVs were 5.4, 8.9, 6.0 and 5.4% ( $n=5$  for each) for the 5, 10, 50 and 800 ng/ml LLOQ,

**Table 2.** Linearity of Calibration Curves for the Determination of SR-0379 Concentrations in Rat Plasma

Nominal Concentration (ng/ml)	Back-calculated Value (ng/ml)	RE (%)	Back-calculated Value (ng/ml)	RE (%)	Back-calculated Value (ng/ml)	RE (%)
5	4.94	-1.2	5.06	1.2	4.93	-1.4
10	9.90	-1.0	10.4	4.0	10.2	2.0
20	21.7	8.5	18.6	-7.0	20.2	1.0
50	49.0	-2.0	43.3	-13.4	47.9	-4.2
100	97.6	-2.4	101	1.0	106	6.0
200	190	-5.0	199	-0.5	195	-2.5
800	801	0.1	834	4.3	803	0.4
1000	1030	3.0	1110	11.0	981	-1.9
Correlation coefficient (r)	0.9988		0.9964		0.9993	
Regression formula	$y = 0.00382x + 0.000174$		$y = 0.00375x - 0.000175$		$y = 0.00391x + 0.00140$	
Weighting: $1/x^2$						

**Table 3.** Intra-day Reproducibility of the QC Samples for the Determination of SR-0379 Concentrations in Rat Plasma

	Nominal Concentration (ng/ml)			
	5	10	50	800
	Observed Value (ng/ml)			
Mean	4.96	10.1	50.1	814
SD	0.27	0.9	3.0	44
CV (%)	5.4	8.9	6.0	5.4
RE (%)	-0.8	1.0	0.2	1.8

respectively (Table 3). The between-run CVs were 7.4, 8.4, 5.5 and 4.9% (n=15), respectively, for these samples (Table 4). The within-day and between-day validation parameters meet the FDA Good Laboratory Practice criteria for an analytical method validation.

### Pharmacokinetic Study

A profile of the SR-0379 concentration in plasma versus time after an intravenous injection is shown in (Fig. 3A). The SR-0379 concentration in the plasma rapidly decreased. The pharmacokinetic parameters for SR-0379 are presented in (Table 5). The area under the concentration to time curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) was 667 ng·min/ml, and the obtained elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) was 4.8 min.

**Table 4.** Inter-day Reproducibility of the QC Samples for the Determination of SR-0379 Concentrations in Rat Plasma

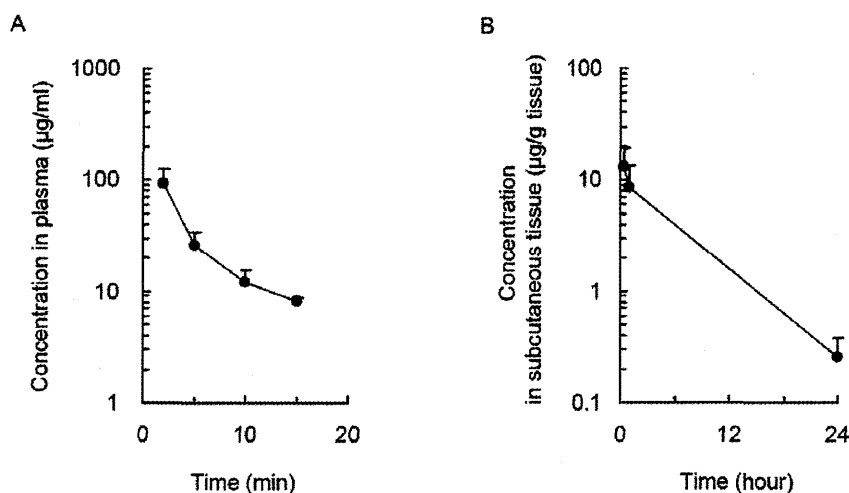
Assay date		Nominal Concentration (ng/ml)			
		5	10	50	800
		Observed Value (ng/ml)			
Day 1	1	4.97	10.1	52.5	743
	2	4.55	9.86	45.1	856
	3	5.20	8.86	50.2	802
	4	5.21	10.7	52.4	830
	5	4.89	11.1	50.3	839
Day 2	1	5.29	10.2	50.4	806
	2	5.29	11.0	49.1	849
	3	5.71	10.2	46.7	828
	4	5.86	8.96	52.3	857
	5	5.00	9.08	48.4	849
Day 3	1	5.45	8.63	50.4	757
	2	5.80	10.4	43.7	765
	3	5.64	9.33	46.2	794
	4	5.58	9.76	46.5	782
	5	4.86	8.84	47.8	868
Overall mean (n=15)		5.29	9.80	48.8	815
SD		0.39	0.82	2.7	40
CV (%)		7.4	8.4	5.5	4.9
RE (%)		5.8	-2.0	-2.4	1.9

The SR-0379 concentrations in plasma were below the limit of quantification after a single application of SR-0379 (1 mg/ml, 50  $\mu$ l) to a full-depth excisional wound. A profile of the subcutaneous tissue concentration versus time for SR-0379 after a single dermal application (1 mg/ml, 50  $\mu$ l) to a full-depth excisional wound is shown in (Fig. 3B). The SR-0379 concentration in the subcutaneous tissue samples was 13.1  $\mu$ g/g tissue at 30 minutes after the application. The concentration in the subcutaneous tissue gradually decreased.

### DISCUSSION

In this study, we developed a method for the quantitative analysis of a functional peptide, SR-0379, in rat plasma and tissue using LC/MS with an ion trap [10-12].

These peptides are unstable in biological fluids, such as plasma and urine [13, 14]. EDTA, a metalloproteinase inhibitor, can be added to the samples to prevent their degradation when determining the concentration [15]. In this study, the stability of SR-0379 spiked into plasma was investigated.



**Fig. (3).** (A) Curve of the plasma concentration versus time after the intravenous administration of SR-0379 (200 µg/kg) to the rats. N=4 per group. (B) Curve of the subcutaneous tissue concentration versus time after the dermal application of SR-0379 (1 mg/ml, 50 µl) to a full-depth wound in the rat skin. N=4 per group.

**Table 5.** PK Parameters of SR-0379 in Rat Plasma after Single Intravenous Administration of SR-0379 to Intact Skin Rats (Group 1, Dose: 200 µg/kg)

Parameters	
$t_{1/2}$ (min)	4.8
AUC <sub>0-t</sub> (ng·min/ml)	626
AUC <sub>0-∞</sub> (ng·min/ml)	667
C <sub>0</sub> (ng/ml)	217
CL <sub>total</sub> (ml/min/kg)	300
Vd (ml/kg)	922
Vd = Dose (ng/kg) / C <sub>0</sub> (ng/ml)	

The results indicated that SR-0379 was unstable in plasma even with EDTA. 4% phosphoric acid was added to improve the stability of SR-0379. Thus, a simple method for determining peptides in biological matrices was established.

The objective of this study was to characterize the pharmacokinetics of SR-0379 using this LC-MS/MS technology. The SR-0379 concentration decreased rapidly following a single intravenous injection of 2 µg/kg into male rats, and an elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) of 4.8 min was obtained. SR-0379 has numerous biological activities that are important to wound healing and this peptide is being developed for topical use to treat diabetic, burn and other incurable ulcers. The terminal half-lives ( $t_{1/2\beta}$ ) ranged from 5.0 to 7 min after administering human basic fibroblast growth factor (FGF2) intravenously to mice in doses of 2.5, 5, 10 µg/kg [16]. The stability of SR-0379 is comparable to that of growth factors such as FGF2.

The SR-0379 concentration in rat plasma was below the limit of quantification after a single dermal application (1 mg/ml, 50 µl) to a full-depth excisional wound. Topical treatments have the advantages of avoiding adverse systemic

effects while increasing concentration at the target site. In contrast, the SR-0379 concentration in the subcutaneous tissue was 13.1 µg/g of tissue 30 min after its application (1 mg/ml, 50 µl) to a full-depth excisional wound. The concentration in the subcutaneous tissue gradually decreased. It was suggested that the SR-0379 degraded locally.

A highly sensitive and specific LC-MS/MS assay with a lower limit of quantification (LLOQ) of 5 ng/ml was developed and validated to quantify SR-0379 in rat plasma. The lower limit of quantification of hepcidin-25 and ramoplanin was 5 ng/ml and 10 ng/ml, respectively [17, 18]. Most bioanalytical assays for peptides show an LLOQ between 0.5 and 10 ng/ml, with some lower LLOQs mainly for smaller peptides. Lower LLOQ of SR-0379 has achieved by using QTRAP5500 mass spectrometer. This method was fully validated and possessed acceptable linearity, accuracy, and both intra- and inter-assay precisions. Furthermore, this method is useful for performing pharmacokinetic studies in rats.

## CONFLICT OF INTEREST

Ryuichi Morishita is a founder and stockholder of AnGes MG. The Department of Clinical Gene Therapy is financially supported by AnGes MG, Novartis, Shionogi, Boehringer and Rohto. The Division of Vascular Medicine and Epigenetics is financially supported by Bayel.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by a Health Labour Sciences Research Grant in Japan.

## REFERENCES

- [1] Nishikawa, T.; Nakagami, H.; Maeda, A.; Morishita, R.; Miyazaki, N.; Ogawa, T.; Tabata, Y.; Kikuchi, Y.; Hayashi, H.; Tatsu, Y.; Yumoto, N.; Tamai, K.; Tomono, K.; Kaneda, Y. Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.*, **2009**, *13*, 535-546.
- [2] Nakagami, H.; Nishikawa, T.; Tamura, N.; Maeda, A.; Hibino, H.; Mochizuki, M.; Shimamoto, T.; Moriya, T.; Morishita, R.; Tamai,

- K.; Tomono, K.; Kaneda, Y. Modification of a novel angiogenic peptide, AG30, for the development of novel therapeutic agents. *J. Cell. Mol. Med.*, **2012**, *16*(7), 1629-1639.
- [3] Eckert, R. Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Future Microbiol.*, **2011**, *6*(6), 635-651.
- [4] Fjell, C.D.; Hiss, J.A.; Hancock, R.E.; Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**, *11*(1), 37-51.
- [5] Li, Y.; Xiang, Q.; Zhang, Q.; Huang, Y.; Su, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, **2012**, *37*(2), 207-215.
- [6] Jiang, S.Y.; Jiao, J.; Zhang, T.T.; Xu, Y.P. Pharmacokinetics study of recombinant hirudin in the plasma of rats using chromogenic substrate, ELISA, and radioisotope assays. *PLoS One*, **2013**, *8*(6), e64336.
- [7] Wang, Y.; Qu, Y.; Bellows, C.L.; Ahn, J.S.; Burkey, J.L.; Taylor, S.W. Simultaneous quantification of davalintide, a novel amylin-mimetic peptide, and its active metabolite in beagle and rat plasma by online SPE and LC-MS/MS. *Bioanalysis*, **2012**, *4*(17), 2141-2152.
- [8] Sands, H.; Li, J.; Duggaraju, R.; Kolan, H.R.; Donegan, M.; Elove, G.A.; Thakur, M.L. Biodistribution and pharmacokinetics of <sup>131</sup>I-labeled LEX 032, a recombinant hybrid of antichymotrypsin. *Drug Metab. Dispos.*, **1997**, *25*(5), 631-636.
- [9] Liu, Z.; Ren, C.; Jones, W.; Chen, P.; Seminara, S.B.; Chan, Y.M.; Smith, N.F.; Covey, J.M.; Wang, J.; Chan, K.K. LC-MS/MS quantification of a neuropeptide fragment kisspeptin-10 (NSC 741805) and characterization of its decomposition product and pharmacokinetics in rats. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2013**, *926*, 1-8.
- [10] Vatansever, B.; Lahrichi, S.L.; Thiocone, A.; Salluce, N.; Mathieu, M.; Grouzmann, E.; Rochat, B. Comparison between a linear ion trap and a triple quadruple MS in the sensitive detection of large peptides at femtomole amounts on column. *J. Sep. Sci.*, **2010**, *33*(16), 2478-2488.
- [11] Miyachi, A.; Murase, T.; Yamada, Y.; Osonoi, T.; Harada, K. Quantitative analytical method for determining the levels of gastric inhibitory polypeptides GIP1-42 and GIP3-42 in human plasma using LC-MS/MS/MS. *J. Proteome Res.*, **2013**, *12*(6), 2690-2699.
- [12] Michalski, A.; Damoc, E.; Lange, O.; Denisov, E.; Nolting, D.; Muller, M.; Viner, R.; Schwartz, J.; Remes, P.; Belford, M.; Duniach, J.J.; Cox, J.; Horning, S.; Mann, M.; Makarov, A. Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Mol. Cell. Proteomics*, **2012**, *11*(3), O111.013698.
- [13] De Spiegeleer, B.; Van Dorpe, S.; Vergote, V.; Wynendaele, E.; Pauwels, E.; Van De Wiele, C.; Garcia-Solis, P.; Solis-Sainz, J.C. *In vitro* metabolic stability of iodinated obestatin peptides. *Peptides*, **2012**, *33*(2), 272-278.
- [14] Ocak, M.; Helbok, A.; Rangger, C.; Peitl, P.K.; Nock, B.A.; Morelli, G.; Eek, A.; Sosabowski, J.K.; Breeman, W.A.; Reubi, J.C.; Decristoforo, C. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2011**, *38*(8), 1426-1435.
- [15] Alebic-Kolbah, T.; Demers, R.; Cojocar, L. Dalbavancin: Quantification in human plasma and urine by a new improved high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2011**, *879*(25), 2632-2641.
- [16] Zhang, Q.; Wang, G.J.; Sun, J.G. Pharmacokinetics of recombinant human basic fibroblast growth factor in rabbits and mice serum and rabbits aqueous humor. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2004**, *25*(8), 991-995.
- [17] Murao, N.; Ishigai, M.; Yasuno, H.; Shimonaka, Y.; Aso, Y. Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, *21*(24), 4033-4038.
- [18] Ewles, M.F.; Turpin, P.E.; Goodwin, L.; Bakes, D.M. Validation of a bioanalytical method for the quantification of a therapeutic peptide, ramoplanin, in human dried blood spots using LC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.*, **2011**, *25*(9), 995-1002.