

# 学位論文要旨

## 非ラメラ液晶形成脂質を含有した皮下投与製剤の開発

岡田 明恵

近年、世界の新薬市場では、医薬品に用いられる薬物が低分子化合物から中・高分子化合物(バイオ医薬品等)に移行し、世界の医薬品売上の上位を占めている。一般的に、バイオ医薬品は通院を伴う点滴や注射による投与が必要のため、患者の Quality of Life(QOL)の維持に加え、通院と仕事の両立支援が重要となる。また近年の、Artificial intelligence(AI)や Internet of Things(IoT)などの進展に伴い新たな医薬品開発法について熟考する時期にも来ている。このことから、自己投与可能な製剤、投与回数を少なくする放出持続型製剤、さらに IoT を利用した薬物投与の最適化を支援する方法などの確立が急務である。これらの背景から著者は、Drug Delivery System (DDS)に Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)や IoT 技術を組み合わせて自己投与でき、かつ薬物放出性や吸収性を外部制御により可能とする装着型製剤(Installable DDS, iDDS)の開発を着想しており、iDDS に応用可能な持続性注射剤に注目した。持続性注射剤とは投与後内封薬物を長期間放出し血中薬物濃度を維持することで効果を示す製剤全般を指し、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)を基剤とした液体の懸濁注射剤と固体の implant または pellet 製剤がある。本研究では、持続性注射剤の基剤として、新規 DDS キャリアとして実用化されつつある非ラメラ液晶(NLLC)に着目した。逆ヘキサゴナル( $H2$ )構造や逆キュービック( $Pn3m$ )構造などの NLLC はリポソーム同等以上の優れた薬物含有性をもち、疎水基を外側に配する構造から高い生体接着性、非破壊的に含有薬物を放出し、優れた薬物保持・徐放能、難溶性化合物の可溶化、タンパク質高次構造の安定化に寄与することが明らかになっている。代表的な NLLC 形成脂質としてモノオレイン酸グリセリル(GMO)が知られており、水と接触することで瞬時に NLLC を形成する。GMO は、医薬品添加剤としてアメリカ医薬品局(FDA)で承認されているものの、室温で固体であるため製剤調製には加温や粘性改善のため添加剤の利用などの工夫が必要であった。そこで、室温で液体・低粘度な新規 NLLC 形成脂質である mono-*O*-(5,9,13-trimethyl-4-tetradecenyl) glycerol ester(MGE)を用い、中分子薬物を含有する持続性注射剤の製剤設計を行った。

### 第1部 非ラメラ形成脂質を用いた持続性注射剤の調製

#### **【第1章 水溶性薬物を内封した持続性注射剤の調製および評価<sup>1)</sup>】**

第1章では、モデル薬物として水溶性中分子蛍光薬物(Fluorescein isothiocyanate-dextran *M.W.* 4,000, FD-4)を選択した。NLLC 形成脂質である MGE に側鎖長が 14~18 程度の種々飽和・不飽和リン脂質を添加し、リン脂質の種類や量が異なる 16 種類の製剤を調製した。小角 X 線散乱(SAXS)装置により調製製剤の測定を行い、NLLC 構造を断定したところ MGE 単体では  $H2$  構造を示し、リン脂質の添加とともに  $Pn3m$  構造または  $H2$  と  $Pn3m$  構造の両方の構造を形成していることがわかった。FD-4 添加により NLLC 構造は変化しなかったことから、FD-4 は NLLC 構造の水チャンネルに存在していると考えられた。また、調製製剤から FD-4 放出性は NLLC 構造の細孔間距離( $d$ )、MGE 含有量、リン脂質含有量、リン脂質の炭素鎖数およびリン脂質の二重結合の有無の 5 つのパラメーターが影響することがわかった。調製した製剤をラット背部皮下に投与したところ、コントロールである FD-4 水溶液は、投与後 24 時間で定量下限値を下回ったのに対し、調製製剤では 48 時間まで血中薬物の定量可能であった。以上の結果より、NLLC 形成脂質である MGE にリン脂質を添加することで、中・高分子薬物の放出制御が可能になることを明らかとした。

## 【第2章 実使用を考慮した LA 内封持続性注射剤の調製および評価<sup>2)</sup>】

モデル薬物として皮下(pH7.40)にて正電荷を有している酢酸リュプロレリン(LA)を選択し、MGE を基剤とした持続性注射剤の調製を行い、製剤を皮下投与後の LA の血中濃度推移を 21 日間にわたり評価した。前章で、リン脂質の種類や添加量により形成する NLLC 構造が変化し、特に、側鎖長が 18 程度の不飽和基を有するリン脂質で徐放性が確認できたことから、本章では、親水基が異なる不飽和基を有する側鎖長 18 のリン脂質を選択し 10 製剤の調製を行った。SAXS による調製製剤の NLLC 構造解析を行ったところ LA の添加の有無で NLLC 構造変化が確認できた。このことから第 1 章で用いた FD-4 と異なり、LA は MGE およびリン脂質と相互作用することで、MGE およびリン脂質により構築された NLLC 構造に影響を及ぼしていることが示唆された。また、LA 添加により NLLC 構造の膜曲率が正に変化することがわかった。

製剤からの LA 放出性は負電荷リン脂質である 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DOPG) を添加した製剤で徐放性が確認でき、徐放性が確認できた製剤について *in vivo* 試験を行ったところ、LA 水溶液と比較し有意なバイオアベイラビリティ(BA)改善効果を示した。以上の結果より、pH7.40 環境下で LA と DOPG が静電的相互作用したことで LA の放出制御が可能であることを明らかにした。

第 1 部の結果より NLLC 形成脂質である MGE は持続性注射剤基剤として有用であると考えられた。

## 第 2 部 NLLC 形成脂質を用いた微粒子製剤の検討

前章では、MGE を持続性注射剤基剤の有用性を明らかにしたものの、MGE は体液と接触すると瞬時に粘性が増加するためマイクロニードル(MN)やマイクロポンプデバイスを用いた自己投与可能な低粘性製剤の調製が必要と考え、BA 改善効果等を有する MGE 含有製剤の調製を行った。本章では、MGE と高分子界面活性剤である Pluronic<sup>®</sup> F-127 からなる分散体を調製し、前章で静電的相互作用による放出制御を利用した皮下投与製剤の調製を試みた。モデル薬物は LA を選択し、MGE と Pluronic<sup>®</sup> F-127 の脂質濃度が異なる製剤(MP<sub>1.0, 5.0, 10</sub> 製剤\*下付きの数字で脂質濃度を示す)を調製した。Cryo-TEM 観察の結果より MP<sub>10</sub> 製剤はミセル形成し、SAXS 測定によりミセル同士が面心立方格子構造(face-centered cubic, FCC)に配位していることがわかった。また、NMR の結果より LA は構成脂質と相互作用していることも明らかになった。調製製剤をラット腹部に皮下投与した。LA 水溶液と比較し BA が、MGE を添加していない P 製剤では 8 倍、MP<sub>10</sub> 製剤は 13 倍改善した。

## 総括

本論文では異なる皮下投与製剤を調製しコントロールと比較し MGE を添加した製剤で有意に BA を改善し注射剤添加剤としての有用性を示し、これらの結果は今後の自己注射可能な注射剤の開発に貢献できると考えられる。

1) A. Okada *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **577**, 118944 (2020).

2) A. Okada *et al.*, *Pharm Res.*, **38**, 503 -513 (2021).

## Thesis summary

### Development of Subcutaneously Administered Formulations Containing Non-Lamellar Liquid Crystal-Forming Lipids

Akie Okada

In recent years, in the global new drug market, drugs have shifted from low-molecular-weight compounds to medium- and high-molecular-weight compounds (biopharmaceuticals, etc.), occupying the top share in global pharmaceutical sales. In general, treatment with biopharmaceuticals requires outpatient treatment by injections and infusion. Therefore, in addition to maintaining the quality of life (QOL) of patients, it is important to support the balancing of ambulatory treatment and work. And also, it is time to reflect on new drug development methods in line with recent advances in artificial intelligence (AI) and the internet of things (IoT). For this reason, there is an urgent need to establish formulations that can be self-administered, sustained-release formulations that reduce the number of doses, and methods to support optimization of drug administration using IoT. With this background, the author conceived the idea of developing a wearable formulation (Installable DDS, iDDS) that can be self-administered by combining the drug delivery system (DDS) with micro electro mechanical systems (MEMS) and IoT technology, and that enable drug release and drug administration by external control. In the present thesis, injectable-formulation with a sustained release was developed that can be applied to iDDS. An injectable formulation with sustained release is effectively work by maintaining the blood concentration by releasing drug for a long period after the administration, and injectable liquid suspension based on polylactic acid-glycolic acid copolymer (PLGA) and solid implant or pellet preparations are well known and have been already used clinical practice.

In this study, non-lamellar liquid crystal (NLLC), which is being commercialized as a new additives for DDS, was selected as a base for long-acting injectable formulation. NLLCs such as reverse hexagonal ( $H2$ ) and reverse cubic ( $Pn3m$ ) structures have excellent drug entrapment efficacy compared with liposomes. They also exhibit high bioadhesiveness by orienting hydrophobic groups outwards and can contribute to drug retention and sustained release by constructing complex internal structures. Furthermore, they can contribute to the solubilization of poorly soluble compounds and the stabilization of higher-order of protein structures. Glyceryl monooleate (GMO) is known as a typical NLLC forming lipid, and it forms NLLC instantaneously by contacting with water. Although GMO have been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as excipients, heating and reducing viscosity agent are necessary to prepare formulations because they exist as a solid state at room temperatur. Therefore, in the present study, a long-acting injectable formulation containing a medium-molecular-weight drug was prepared with mono-*O*-(5, 9, 13 trimethyl -4 tetradecenyl) glycerol ester (MGE) with low viscosity at room temperature.

#### Part 1: Preparation of Sustained Release Injections using Non-Lamella-Forming Lipids

##### 【Chapter 1 Preparation and Evaluation of Sustained Release Injections Encapsulated with Water-soluble Drugs<sup>1)</sup>】

A water-soluble medium-molecule fluorescent drug (fluorescein isothiocyanate-dextran *M.W.* 4,000, FD-4) was selected as the model drug. Sixteen preparations were prepared by adding various saturated and unsaturated phospholipids to MGE. The structure of prepared formulation was investigated by small angle X-ray diffraction (SAXS). The prepared formulation with MGE alone showed  $H2$  structure. It, however, formed  $Pn3m$  or both  $H2$  and  $Pn3m$  structure by the addition of phospholipids in the formulation. The addition of FD-4 did not change the NLLC

structure, suggesting that FD-4 exists in the water channel of the NLLC structure. It was also found that FD-4 release from the preparation was highly related to the interpore distance ( $d$ ) of the NLLC structure, MGE content, phospholipid content, carbon chain number of phospholipid, and existence of double bond in phospholipid. When the prepared formulation was administered subcutaneously to the back of rats, the lower limit of quantification was reached at 24 h after the administration of FD-4 solution, whereas the prepared formulation was able to maintain the blood concentration of FD-4 even 48 h after the administration. These results suggested that the addition of phospholipids to MGE can control the release of medium molecular-weight drugs.

### **【Chapter 2 Preparation and Evaluation of Injectable LA Encapsulated Formulation Considering Actual Use<sup>2)</sup>】**

Leuporelin acetate (LA), which is unstable in skin tissue, was selected as a model drug. In this chapter, oleyl phospholipids were selected, and 10 formulations were prepared. SAXS observation revealed that the structure changed was confirmed with or without LA, suggesting that LA interacted with MGE and phospholipids, thereby LA addition affects NLLC structure. In addition, the membrane curvature of the NLLC structure was changed positively by addition of LA. The sustained release of LA from the formulation containing 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DOPG), a negatively charged phospholipid, was confirmed. When the formulation containing DOPG was subcutaneously injected, significant improvement in bioavailability ( $BA$ ) was confirmed compared to the LA solution. These results indicate that the electrostatic interaction between LA and DOPG in a pH 7.40 environment enables the preparation of a long-acting injectable formulation containing LA with controlled release of LA for 21 days. Based on these results, MGE, an NLLC-forming lipid, was considered to be useful as an additive to prepare a long-acting injectable formulation.

### **Part 2: Preparation of nanodispersion using NLLC-forming lipids**

In the previous chapter, MGE was shown to be useful as an additive to prepare a long-acting injectable formulation. However, MGE instantly increases its viscosity when it contacts with body fluids. Thus, it is necessary to prepare a low-viscosity formulation that can be self-administered using a microneedle (MN) or micropump device. In this chapter, nanodispersion consisting of MGE and a polymeric surfactant of Pluronic<sup>®</sup> F-127 in order to reduce the viscosity of the prepared formulation. LA was selected as the model drug, and formulations with different lipid concentrations (MP<sub>1.0</sub>, MP<sub>5.0</sub>, and MP<sub>10</sub> formulations: \*subscript numbers indicate lipid contents) were prepared. Cryo-TEM results showed that the MP<sub>10</sub> formulation formed micelles, and SAXS measurements showed that the micelles were coordinated in a face-centered cubic ( $FCC$ ) lattice structure. Nuclear magnetic resonance results also revealed that LA interacted with the lipids in the formulation. The preparations were administered subcutaneously, and compared to the aqueous LA solution,  $BA$  was improved 13 times with MP<sub>10</sub> compared with LA aqueous solution. On the other hand, only an 8-fold improvement in  $BA$  was obtained in the P-formulation that prepared without MGE. MP<sub>10</sub> showed higher  $C_{max}$  and shorter  $T_{max}$  than P-formulation. These results suggest that MGE has the potential to be an absorption enhancer for subcutaneously administered drugs.

**Summary:** In this thesis, NLLC structure consisted of MGE was controlled by adding phospholipid, and controlled released and improved  $BA$  were confirmed after subcutaneously injection of FD-4 and LA. These results suggest that MGE be useful as an additive to prepare a long-acting injectable formulation that be available for iDDS.

1) A. Okada *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **577**, 118944 (2020). 2) A. Okada *et al.*, *Pharm Res.*, **38**, 503 -513 (2021).

## 論文審査の結果の要旨

近年、医療費削減の観点から通院回数の低減や入院日数の減少等を目的とした医療費削減への観点より、自己投与可能な製剤に注目が集まっている。その技術の進展はめざましく micro electro mechanical systems (MEMS) や internet of things (IoT) 技術を応用した microneedle (MN) やマイクロポンプデバイスなどの小型電子機器を活かした薬物投与システムの研究・開発が行われている。岡田明恵氏は、将来的に drug delivery system (DDS) にこれら技術を組合せることで、自己投与でき、かつ薬物放出性や吸収性を外部制御可能とする installable DDS (iDDS) の開発を着想した。本論文では、iDDS に応用可能な持続性注射剤および MN などとの併用利用を可能とする微粒子製剤の調製を試み、その際、中分子薬を含め様々な物性を有する薬物の持続的な送達を可能とする新規製剤素材として、non-lamellar liquid crystal (NLLC) に着目した。NLLC は、疎水基を外側に配する構造から高い生体接着性を有しており、非破壊的に含有薬物を放出し、難溶性化合物の可溶化、さらにはタンパク質高次構造の安定化に寄与することが明らかになっている。NLLC 形成脂質の新規素材として、水と接触することで NLLC を形成する株式会社ファルネックスが開発した mono-*O*-(5,9,13-trimethyl-4-tetradecenyl) glycerol ester (MGE) を選択し、それらの課題に取り組んだ。その成果は、「非ラメラ液晶形成脂質を含有した皮下投与製剤の開発」としてまとめられている。以下にその内容を要約する。

### 第1部 NLLC 形成脂質を用いた持続性注射剤の調製

#### 第1章 水溶性中分子薬物を内封した持続性注射剤の調製および評価

モデル薬物に水溶性中分子蛍光薬物である fluorescein isothiocyanate-dextran M.W. 4,000 (FD-4) を選択し、異なる種々の飽和・不飽和リン脂質を添加し、16 種類の製剤を調製した。small-angle X-ray scattering (SAXS) 装置により調製製剤を測定して NLLC 構造を判定したところ、MGE 単体では reverse hexagonal (*H2*) 構造を示し、リン脂質の添加とともに reversed bicontinuous cubic (*Pn3m*) 構造または *H2* と *Pn3m* 構造の両方の構造を形成していることが確認された。調製製剤に FD-4 を添加して構造解析したところ、NLLC 構造に変化が認められなかったことから、FD-4 は NLLC 構造の水チャンネルに存在していると推察している。そして、調製製剤からの FD-4 放出性は、NLLC 構造の interplanar spacing (*d*)、MGE 含有量、リン脂質含有量、リン脂質の炭素鎖数、およびリン脂質の二重結合の有無の5つのパラメーターに影響を受けることを明らかにしている。調製製剤をラット背部皮下に投与した検討において、コントロールである FD-4 水溶液での血中濃度は、投与後 24 時間で定量下限値を下回ったのに対し、調製製剤では 48 時間まで血中濃度の定量が可能であった。このことから、MGE にリン脂質を添加して NLLC とすることにより、中・高分子薬物の放出制御が可能であり、新規持続性注射剤の開発に有益な知見を得ている。

#### 第2章 実使用を考慮した leuprolide acetate (LA) 内封持続性注射剤の調製および評価

MGE を用いた NLLC の有用性を異なった物性を有する薬物でも確認するために、モデル薬物として中性で正電荷を有する LA を選択し、MGE を基剤とした持続性注射製剤を調製し、製剤からの LA 放出性と製剤を皮下投与した後の LA 血中濃度推移を 21 日間にわたり評価している。これまでにリン脂質の側鎖長が 18 程度で不飽和結合を有するリン脂質で徐放性が確認されていることから、親水基が異なる不

飽和結合を有する側鎖長 18 のリン脂質を選択し、10 種類の製剤を調製して検討している。SAXS 測定により調製製剤の NLLC 構造を解析した結果、LA の添加の有無で NLLC 構造変化が確認され、第 1 章で用いた FD-4 と異なり LA は、MGE やリン脂質と相互作用することにより NLLC 構造に影響を及ぼしていることを推察している。また、負電荷リン脂質である 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3- phosphoglycerol, sodium salt (DOPG)を添加した製剤で LA の *in vitro* 徐放性が確認されたため、*in vivo* 試験が行われ、LA 水溶液と比較して有意な生物学的利用能(BA)改善効果を得ている。このことは、pH7.4 環境下で LA と DOPG が静電的相互作用したことが関係しており、処方設計により LA 放出制御が可能であることを明らかにしている。この知見は、含有薬物の物性に合わせた持続性注射剤の開発において有益なものとして示されている。

第 1 部において、NLLC 形成脂質である MGE は、持続性注射剤基剤として利用可能であり、それにリン脂質などを添加していくことで、含有させる薬物の物性に合わせた放出制御が可能な注射剤を設計できることを示したことは高く評価できる。

## 第 2 部 NLLC 形成脂質を用いた微粒子製剤の検討

前章で MGE を用いた NLLC 形成脂質の持続性注射剤基剤としての有用性が明らかにされたが、MGE を含む系は、体液と接触すると瞬時に粘性が増加するため、自己投与可能な MN やマイクロポンプデバイスを用いた持続的投与が困難である。それを可能にするためには、粘性が低く、かつ BA 改善効果等を有する MGE 含有微粒子製剤の調製が求められる。第 2 部では、MGE と高分子界面活性剤である Pluronic® F-127 からなる微粒子製剤を調製し、第 1 部第 2 章において示した静電的相互作用による放出制御を利用し、LA を持続的に放出する皮下投与製剤の調製を試みている。すなわち、各組成を有する MGE と Pluronic® F-127 およびリン脂質からなる製剤を調製し、それらの特性を検討したところ、透過型電子顕微鏡観察の結果より、MGE とリン脂質を含む製剤ではミセルの形成が観察され、SAXS 測定によりミセル同士が面心立方格子構造 face-centered cubic に配位していることが示され、また、NMR の結果より、LA は構成脂質と相互作用していることも明らかにしている。調製製剤をラット腹部に皮下投与した検討において、LA 水溶液と比較し、MGE を添加していない製剤では 8 倍、MGE とリン脂質を含む製剤では 13 倍の BA 改善効果を確認した。

以上、MGE とリン脂質を組合せることにより、疎水基を外側に配する構造から高い生体接着性を有し、非破壊的に含有薬物を放出し、難溶性化合物の可溶化とタンパク質高次構造の安定化が期待できる NLLC を形成し、さらに微粒子製剤化することも可能であることを示した。この基剤は、加水分解により薬物徐放性を示す生分解性高分子微粒子製剤として持続性注射剤や懸濁製剤として使用されている poly-lactide-co-glycolide acid 等のポリマー基剤の代わりになり得る可能性を見出し、MEMS や IoT 技術を応用した MN やマイクロポンプデバイスなどの小型電子機器を用いた新しい時代の要求に応える新規 iDDS の開発に貢献するものとして高く評価できる。

これらの実験は、論理的に計画され、また実施されており、研究倫理における問題も指摘されない。その研究成果は、投稿論文として公表されており、本論文は本研究科課程による博士（薬科学）の学位を与えるに十分値するものである。従って、論文審査結果を合格と判断する。