

## 《若手研究者紹介》



## 物性と動態制御を基盤としたペプチド性粉末吸入製剤の開発

尾 上 誠 良\* Satomi Onoue

静岡県立大学薬学部薬物動態学分野

## 1. はじめに

外資系製薬企業勤務であった筆者がアカデミアに転身後、約5年が経過しようとしているが、企業所属時に経験した研究開発業務は今でも自分自身のバックボーンになっている。企業研究者となって1年目の夏、生理活性ペプチド研究の第一人者であった故・矢内原昇先生（静岡県立大学薬学部名誉教授、株式会社矢内原研究所取締役）が、当方が当時所属していた食品会社医薬品部門の顧問に就任された。それまでペプチドについて全く下地のなかった筆者は大いに刺激を受け、たいへん厳しくも温かい先生独特の御指導を受ける好機を得た。その頃から闘病生活を送っておられた先生は残念ながら2001年に急逝され、その後、奥様の故・矢内原千鶴子先生（元・大阪薬科大学理事長、2011年に御逝去）が救いの手を差し伸べて下さり、引き続き御指導を受けることになった。予期せぬうちに矢内原御夫妻による指導を受けることが出来た筆者はたいへん幸運と常々感謝しつつ研究活動を進め、また、この御指導の御陰でその後の自分自身の研究方向性が徐々に固まっていった。メガファーマ勤務を経てアカデミアに転身後は、企業における業務経験を少しでも学生

\*1998年岡山大学大学院薬学研究科卒。約10年間企業研究者として従事し、2007年にファイザーより静岡県立大学薬学部薬物動態学分野講師に就任。2010年より現職（准教授）。2011年日本薬学会東海支部学術奨励賞受賞。2012年日本薬剤学会奨励賞受賞。研究テーマ：薬剤科学。研究のモットー：「楽観的に構想し、悲観的に計画し、楽観的に実行する（稲盛和夫氏の格言）」。  
趣味：釣れない魚釣り、B級グルメ。連絡先：〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1  
E-mail: onoue@u-shizuoka-ken.ac.jp

に伝え、創薬研究だけではなくそれを支援する co-discovery 研究も重要であることを説くように努めている。本稿では企業・大学において筆者がこれまでに携わったペプチド製剤研究の中で、特に粉末吸入製剤に焦点を置いて紹介する。

## 2. 血管作動性腸管ペプチド誘導体の粉末吸入製剤

一般に生理活性ペプチドは物理化学的ならびに生物化学的にハンドリングが容易でないことが多く、それ故、それらを医薬応用するには多くの化学的あるいは薬剤科学的な工夫が必要となる。具体的には (i) 構造改変による代謝安定性の向上、(ii) 作用持続のための製剤学的工夫、(iii) 副作用回避のための特異的薬物送達法の開発等を余儀なくされることがあるが、筆者も新人時代はこれらの命題に取り組み、複数の生理活性ペプチドあるいはその誘導体群を対象として試行錯誤をくり返した。ここでは血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) の医薬応用を紹介する。

VIP は強い抗炎症作用と気管支平滑筋弛緩作用を併せ持ち、これらの興味ある生理活性により、炎症性呼吸器疾患治療薬としての応用が強く期待されていた。また、網羅的な臨床調査によって、呼吸器系におけるVIP欠損と喘息発症の因果関係を示唆するデータが得られ、VIP受容体アゴニストの喘息治療薬としての可能性がより強く支持されることとなった。しかしながら、VIPは内因性の物質であるが故に体内においてペプチダーゼによって速やかに分解され、作用持続が短くなることに加え、経口投与では生物学的利用率が低いいため薬理効果が発現しにく

いなどの問題点が指摘されてきた。また、静脈内投与などの非局所投与では低血圧やその他の副作用の危険性が高まると予測される。これらの短所を克服するため、近年、戦略的創薬の観点から生物学的に安定なVIP誘導体の合成と標的臓器への特異的な薬物送達を指向した新規製剤の開発がグローバルに進められている<sup>1)</sup>。筆者らのグループは合成したVIP誘導体を用いて代謝安定性やアデニル酸シクラーゼ活性化作用を指標にVIPの構造活性相関研究を網羅的にを行い、その結果、15, 20, 21番目のアミノ酸残基であるLysをArgに変更し、17番アミノ酸残基のMetをLeuに置換したVIP誘導体([R<sup>15,20,21</sup>, L<sup>17</sup>]-VIP)は代謝安定性において著しい改善をもたらした。さらに、この誘導体のC-末端を延長させた[R<sup>15,20,21</sup>, L<sup>17</sup>]-VIP-GRRは更に高い代謝安定性を有し、*in vitro* および *in vivo* において天然のVIPよりも高い生物活性を示した。代謝安定性に優れたVIP誘導体を得たものの、VIPまたはその誘導体の経口投与は低い酸安定性と乏しい膜透過性のために現実的ではなく、それ故、注射剤あるいはその他の投与形態の開発が医薬応用に際して必要不可欠となる。そこで筆者らのグループはVIP誘導体の興味ある各種活性を確認したことにより、喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)への適用を目指した粉末吸入製剤試作を検討した。吸入する粒子の粒径は薬物の肺到達量あるいは到達部位に大きな影響を与えることが既に報告されており、特に数 $\mu\text{m}$ 程度の粒径が好ましいとされている。しかしながら、あまりにも細かい粒子(<0.5 $\mu\text{m}$ )はタバコの煙と同様に呼気と共に体外に出てしまうリスクがあるため、粒径のコントロールは極めて重要である。筆者らは製剤の平均粒径を5 $\mu\text{m}$ 以下にすべく、VIP誘導体とエリスリトールの混合物をJet-millにて粉碎した。続いて粒径50~60 $\mu\text{m}$ の乳糖キャリア(Respitose SV-003, DMV Japan)と混和することによって、安定した粉末吸入製剤を得た。本製剤はカスケードインパクターを用いた*in vitro* delivery 予測試験において、吸入したVIP誘導体のうち約30%が気道あるいは肺へ到達することを確認でき、吸入時の肺局所における薬効発現が期待できる。本粉末吸入製剤の薬理効果について、喘息/COPDモデル動物を用いて検証したところ、肺組織における炎症性細胞の浸潤、アポトーシスの誘導、ムチン産生亢進や炎症性

バイオマーカーの向上などが有意に抑制されることが明らかとなった。すなわち持続型VIP誘導体がCOPD初期過程における炎症状態を改善することが示唆され、粉末吸入製剤とすることで全身性の副作用軽減を実現できれば新規COPD治療薬としての可能性がより大きくなるものと考えられる。

### 3. 難水溶性ペプチドの非晶質製剤開発と吸入剤への応用

現在の創薬システムから生み出される医薬品候補物質の多くは難水溶性であり、それ故、適切な製剤設計や原薬形態選択によって生物学的利用能や薬理効果そのものを高めることが要求される。ペプチドは一般的に水溶性が高いことが殆どであるが、稀に難水溶性ペプチドも医薬シーズとなることがある。ここで紹介するのは環状ペプチド cyclosporine A (CsA) の製剤化検討であり、本物質は Biopharmaceuticals Classification System (BCS) class 2 に分類される難水溶性ペプチドである。

CsAはカルシニューリン阻害薬であり、臨床においては主に臓器移植後における拒絶反応の抑制、尋常性乾癬の治療薬として使用されているが、近年、喘息モデル動物において、好酸球の成熟・分化の抑制作用、気道組織における好酸球浸潤抑制作用等の興味ある薬理活性を認めている。また、米国において、ステロイド依存性の慢性喘息患者における臨床試験でもその有用性が報告されており、CsAの喘息治療薬としての臨床応用が強く期待されている。しかし、CsAの経口投与による使用は腎毒性・肝毒性をはじめとする全身性の副作用を惹起することから、経口投与以外の投与ルートが開発が必須である。しかしながらCsAは非常に溶解性が低いために製剤設計が困難なものとなっており、残念なことに溶解性改善を目的として加えられた添加剤による副作用発現も臨床報告されている。これらを解決するため、筆者らはジルコニアビーズと自転公転型攪拌機を用いてWet-millを用いCsAを非晶質固体分散体制剤とすることで物性改善を行い、この固体分散体制剤を粉末吸入製剤として応用することで薬効の上昇、また低用量局所投与による全身曝露の軽減を試みた<sup>2)</sup>。各種水溶性ポリマー共存下でのWet-mill処理の結果、固体分散体の形成を確認し、熱分析や粉末X線回折によって製剤中に分散しているCsAは非晶

質として存在していることが示唆された。FT-IRで製剤中CsAの高次構造を評価したところ、アミド領域のスペクトルパターンから $\beta$ シート構造をはじめとする高次構造の変化を示唆した (Fig. 1A)。スペクトル上の変化は、製剤中におけるCsAとポリマー間の相互作用によるものと考え、これが非晶質状態の長期保持に寄与するものと考察した。また、CsAの固体分散体制剤化は顕著な溶解性の改善をもたらし、その溶解性改善は使用するポリマーの種類によって大きく異なる傾向を認めた (Fig. 1B)。特にhydroxypropyl cellulose (HPC)を用いて固体分散体制剤において顕著な溶出改善を認め、また、同種のポリマー間においては分子量や粘度が薬物放出特

性を制御する因子となっていることを示唆するデータを得た。比較的分子量の小さいHPCを用いた固体分散体制剤の水における初期溶出速度は結晶CsAと比して約150倍にも及んだが、高分子量のHPCを用いた場合にはその溶出速度は約22倍の改善に留まった。分子量360 kDaのPVPを用いた際には極めて限定的な溶解性改善を認め、その初期溶出速度は結晶CsAのそれと比べて約3倍であった。一般に薬物の溶解は固体表面で起こる不均一反応であり溶質が界面から内部溶液中へと移動する拡散過程が律速となることが多いが、Stokes-Einstein式によれば薬物分子の拡散係数は粘度に反比例しており、今回の知見と矛盾しない。また、結晶CsA、物理混合物、CsA固体分散体制剤 (それぞれ10 mg CsA/kg)をラットに経口投与した際、その生物学的利用率において結晶CsAと物理混合物間に有意な差を認めなかったが、固体分散体制剤は結晶CsAと比して約26倍の向上を示した。CsAはBCS class 2に属する薬物であるので、経口吸収性の顕著な改善はCsA溶解性の上昇によるものと考えられる。

次に、本固体分散体制剤を吸入剤へと応用するため、Jet-millを用いて粉碎し、吸入用ラクトースキャリアーと混合して粉末吸入製剤を調製した。走査型電子顕微鏡観察において、ラクトースキャリアーの表面にJet-millによる微細化粉末が付着した形態を認め、キャリアー粒子の添加により微細粒子の自己凝集が防がれていた。カスケードインパクトを用いて*in vitro*吸入特性を精査したところ、本吸入製剤はfine particle fractionが約54%、カプセルからの放出量が約96%でありその高い分散性と吸入特性を確認した (Fig. 2A)。抗原感作喘息モデルを用いて気道における炎症性細胞浸潤を評価したところ、薬物非投与群と比較し、新規粉末吸入製剤(100  $\mu$ g/rat)を気道内投与した際には85%の抑制を示し、他の炎症性バイオマーカーの有意な低下を認めた。粉末吸入製剤への応用によって肺局所での作用発現と低用量化を実現し、腎毒性等の全身性副作用を惹起すると考えられている投与量(10 mg/kg)のCsAを経口投与した際と比べて、薬理的有効投与量(100  $\mu$ g/rat)のCsA粉末吸入製剤を気道内投与した際には約100分の1程度までの血中曝露量の低下に成功した (Fig. 2B)。今回使用したWet-mill法は新しい固体分散体制剤調製技術であり、コスト面やス

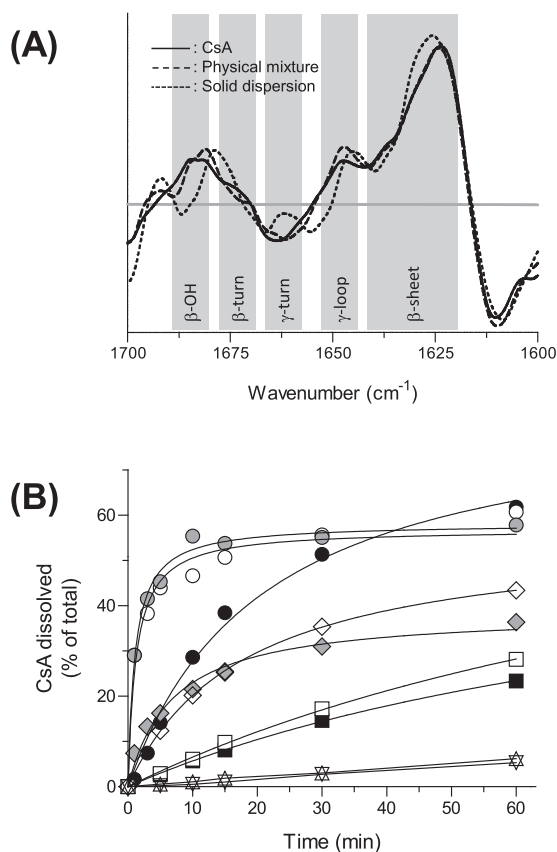


Fig. 1. Physicochemical characterization of CsA-loaded solid dispersions. (A) Second derivative IR spectra on solid dispersion of amorphous CsA with hydroxypropyl cellulose (HPC). (B) Dissolution profiles of CsA-loaded solid dispersions in deionized water.  $\nabla$ , Amorphous CsA;  $\triangle$ , solid dispersion of amorphous CsA with pullulan;  $\circ$ , HPC (SSL);  $\bullet$ , HPC (L);  $\bullet$ , HPC (H);  $\square$ , polyvinylpyrrolidone (PVP: K30);  $\blacksquare$ , PVP (K90);  $\diamond$ , methylcellulose; and  $\blacklozenge$ , hydroxypropyl methylcellulose (HPMC).

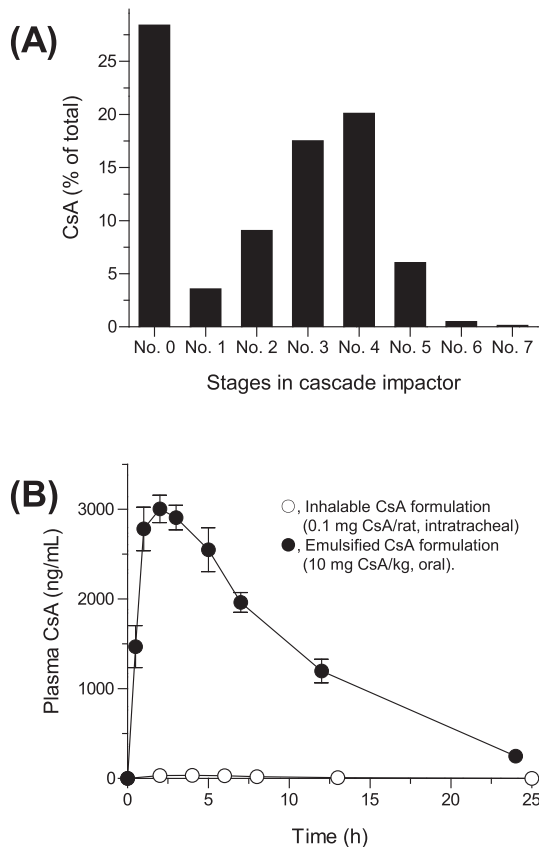


Fig. 2. Inhalable powder formulation of CsA. (A) *In vitro* inhalation performance as determined by cascade impactor analysis. (B) Plasma CsA concentrations in rats after oral and intratracheal administration of CsA formulations. Mean  $\pm$  SE ( $n = 4-6$ ).

ケールアップの面において今後の改善が必要となるが、CsA 固体分散体製剤の粉末吸入製剤への発展的応用は高い薬効と薬物全身曝露量低下を望めることから、安全な喘息治療に寄与できることを示唆した。今回紹介した固体分散体製剤に加えて筆者らは最近、CsA のドライエマルジョン製剤を噴霧乾燥法で新規に調製し、さらに粉末吸入製剤への応用を模索したところ、喘息/COPD モデルラットにおいて薬効の早期発現と腎臓への副作用惹起を回避することに成功した。今後、各種検討を重ねることで処方の変更なる最適化を行い、他の BCS class 2 薬物の易溶化、また難水溶性薬物の粉末吸入製剤への応用が期待される。

#### 4. アミロイド線維形成性を有する生理活性ペプチドの吸入製剤設計

一般に、生物の中で作られるタンパク質やペプチドの多くはその配列情報に基づき、ある特定の立体

構造へと折りたたまれることで機能を発現している。しかしながら、一部のタンパク質やペプチドは低 pH 条件や高濃度条件など様々な条件下において高次構造変化を伴う凝集を引き起こし、不溶性のアミロイド線維を形成することが知られている。このような不溶性アミロイド線維の産生はアルツハイマー病、パーキンソン病といったアミロイドーシスでも認められるが、インスリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド、カルシトニン等の治療用タンパク質・ペプチドも同様にアミロイド線維形成を示す。そして、アミロイドーシス関連ペプチド由来のフィブリルが caspase の活性化によるアポトーシスを引き起こすといった報告から、治療用ペプチドのフィブリルも細胞傷害性を示すことが懸念される<sup>3)</sup>。ここでは、製剤の調製過程および長期保存中におけるアミロイド線維形成を抑制しつつ、安全かつ有効性の高いグルカゴン徐放性製剤を調製した試みを紹介する。

膵全摘患者に対して血糖、肝機能ならびに脂質代謝を維持するため膵臓由来ホルモンであるグルカゴンとインスリンを補填するグルカゴン-インスリン療法が行われてきた。しかし、ペプチドは短半減期による頻回投与、注射に限定される投与経路が問題となり、これが治療コンプライアンスおよび患者の quality of life (QOL) 低下を招いている。糖尿病患者数が多いことからインスリン非注射製剤は積極的に開発されているが、グルカゴンに関しては製剤研究が必ずしも十分ではない。そこで筆者らは、グルカゴンを非侵襲的に投与するために経気道内投与経路を選択し、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) を利用し、徐放性を持つグルカゴン粉末吸入製剤の開発を試みた<sup>4)</sup>。ところでグルカゴンは、低 pH や高濃度条件下で自己凝集を起こすことが報告されている。2.5 mg/mL 以上の濃度で 24 時間エージングしたグルカゴンを CD スペクトル、電子顕微鏡観察、アミロイド特異的染色によって分析したところ、アミロイドーシス原因ペプチド類のような不溶性アミロイド線維形成を認めた (Fig. 3A)。興味深いことにラット神経様細胞ならびに肺胞上皮細胞にこのグルカゴン由来アミロイド線維を曝露したところ、濃度依存的な細胞毒性を示し、その毒性機序の一つに caspase-3 の活性化が含まれることを示唆した (Fig. 3B)。本知見を考慮すれば、一定濃度以上のグルカゴン溶液は細胞毒性を有するアミロイ

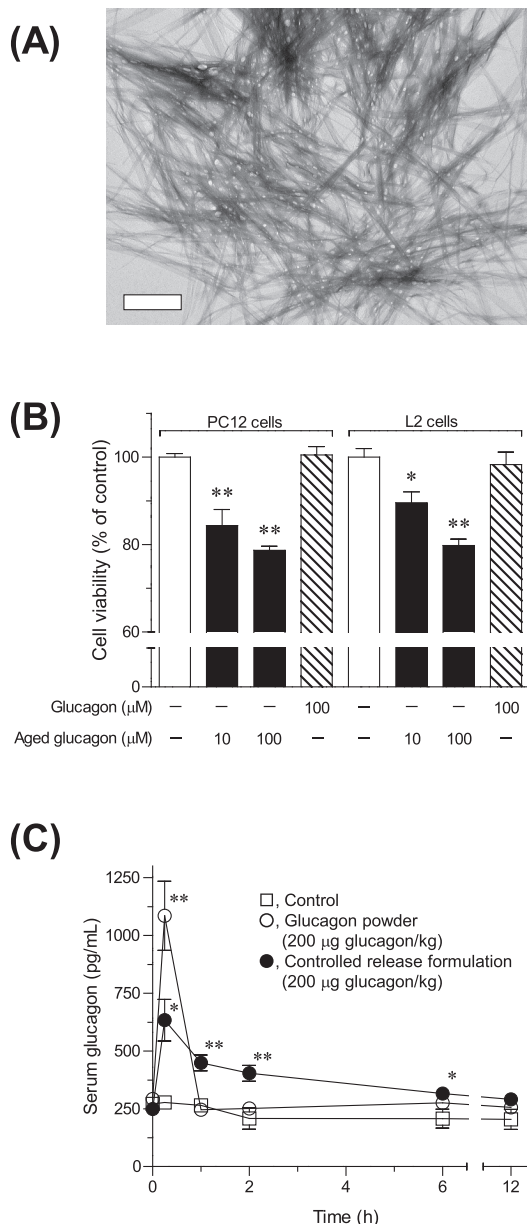


Fig. 3. Glucagon and its inhalable powder formulation. (A) Transmission electron microscopic image of glucagon fibrils. Bar = 0.5 μm. (B) Viability of neuron-like PC12 cells and rat alveolar L2 cells after 75 h exposure to glucagon fibrils. Mean ± SD (n = 6). \*\*p < 0.01 and \*p < 0.05 vs. control group. (C) Serum glucagon concentrations in rats after intratracheal administration of glucagon formulations. Mean ± SE (n = 4). \*\*p < 0.01 and \*p < 0.05 vs. control group.

ド線維形成の可能性があり、グルカゴンの高次構造変化回避は製剤開発において考慮すべき課題の一つであろう。次に、製剤調製時のグルカゴン濃度に留意して作用持続型グルカゴン粉末吸入製剤の開発を試みた。エマルジョン溶媒拡散法によって徐放性製

剤を調製したところ、製剤調製時のグルカゴン濃度に依存してグルカゴン高含有率を獲得したが、高濃度調製時には製剤中のグルカゴンがβシート形成を伴った凝集を起こし、製剤投与後の局所毒性が懸念される。そこで、含有率ならびに毒性の観点から調製条件を最適化することで、アミロイド線維を含まないグルカゴン徐放性粉末製剤を設計した。本製剤はナノサイズの粒子径を持ち、初期バーストおよびその後の徐放性放出により24時間以内で約70%のグルカゴン放出を認めた。本粉末製剤をJet-mill処理することによって得たグルカゴン徐放性粉末吸入製剤の吸入特性評価を行ったところ、粉末吸入製剤として適切な吸入特性を持つことを示した。グルカゴン徐放性粉末吸入製剤をラットに投与した際、コントロールとして作製した非徐放性グルカゴン粉末吸入製剤と比較して持続した血糖上昇作用を認めた。血中グルカゴン濃度の消失時間が両製剤間で20倍以上異なっており、本知見はラット肺内におけるグルカゴン持続放出を示唆するものである (Fig. 3C)。以上、開発した新規製剤は、調製過程におけるアミロイド線維形成を抑えるとともに長期間持続した薬理作用を示し、投与回数が少ない非侵襲投与形態として今後の展開が期待される。

## 5. おわりに

本稿ではペプチド性粉末吸入製剤を中心に紹介したが、筆者らのグループは低分子化合物の物性や動態制御による新規固形製剤研究も実施しており、治療コンプライアンスの向上を指向した製剤開発を目指している。また、本稿では紙幅の関係上取り扱わなかったが、物性を指標とした副作用リスク評価系の開発を行い、レギュラトリーサイエンス上の貢献を目指した試みも進めているが詳細は総説を参照されたい<sup>5)</sup>。近年、新薬開発コストの肥大化や安全基準の厳格化等により低分子医薬品のブロックバスター開発が非常に困難であると考えられているが、その一方、抗体医薬をはじめとする biologics はメガファーマの portfolio の中で重要な位置付けとなっている。これら biologics の投与形態は注射に限定されることが殆どであるが、点鼻、経皮、吸入製剤をはじめとする多くの非侵襲的投与形態研究が将来的に biologics の開発をアシストすることを強く期待したい。

## 引用文献

- 1) S. Onoue, S. Yamada, T. Yajima, Bioactive analogues and drug delivery systems of vasoactive intestinal peptide (VIP) for the treatment of asthma/COPD, *Peptides*, **28**, 1640–1650 (2007).
- 2) S. Onoue, H. Sato, Y. Kawabata, T. Mizumoto, N. Hashimoto, S. Yamada, In vitro and in vivo characterization on amorphous solid dispersion of cyclosporine A for inhalation therapy, *J. Control. Release*, **138**, 16–23 (2009).
- 3) S. Onoue, K. Ohshima, K. Debari, K. Koh, S. Shioda, S. Iwasa, K. Kashimoto, T. Yajima, Mishandling of the therapeutic peptide glucagon generates cytotoxic amyloidogenic fibrils, *Pharm. Res.*, **21**, 1274–1283 (2004).
- 4) S. Onoue, K. Kuriyama, A. Uchida, T. Mizumoto, S. Yamada, Inhalable sustained-release formulation of glucagon: in vitro amyloidogenic and inhalation properties, and in vivo absorption and bioactivity, *Pharm. Res.*, **28**, 1157–1166 (2011).
- 5) S. Onoue, Y. Seto, G. Gandy, S. Yamada, Drug-induced phototoxicity; an early in vitro identification of phototoxic potential of new drug entities in drug discovery and development, *Curr. Drug Saf.*, **4**, 123–136 (2009).