

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	溝口 雅之
学位授与の日付	平成28年3月31日	
論文名	<b>Application of lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) as a novel solubilizer for solid oral dosage forms</b> (リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の経口固形製剤開発における新規可溶化剤としての応用)	
論文審査委員	主査	乾 隆
	副査	杉本 憲治
	副査	山地 亮一

## 論文要旨

### 序章

医薬品の創薬研究における手法が従来の細胞や臓器の表現型 (**phenotype**) を用いた **Phenotype screening** から、薬効発現のメカニズムを基にあらかじめ標的タンパク質を設定しコンピュータを用いリード化合物を設計する **Target based screening** へと移行している。その結果、**Phenotype screening** の過程で確認されていたリード化合物の溶解度などの物理化学的性質は、標的タンパク質との構造的な親和性を重視したコンピュータ上での分子設計においては評価されず、結果として物理化学的性質に問題を抱えた医薬品候補化合物が開発段階に溢れた状況となっている。医薬品の溶解度に関して、現在市場で扱われている医薬品における難溶性化合物（生理的 **pH** 範囲において、臨床最高投与量を溶解するために **250 mL** 以上の溶媒を必要とする）の割合は約 **40%**であるのに対して、現在開発されている医薬品候補化合物は約 **90%**が難溶性化合物となっている。薬物の体内吸収のためには、必ず薬物の溶解過程を経なければならないため、医薬品候補化合物の溶解度を改善することは開発段階において大きな課題である。難溶性化合物の溶解度改善に関しては、プロドラッグ化や塩形成など化合物を直接化学修飾する手法やシクロデキストリンや界面活性剤といった可溶化剤を添加することによる溶解度改善など、様々な手法が検討されて

いる。しかし、溶解度改善の一方で薬理活性や安定性の低下、製造性の複雑化が伴うため溶解度の向上と同時に多くの因子に関する検証が必要であり、より簡便な溶解技術の開発が求められている。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (**L-PGDS**) は、中枢神経系に高発現し、ヒト脳脊髄液中においては血清アルブミンに次いで 2 番目に多く存在するタンパク質である。また、**L-PGDS** は生体内において多くの機能を有していることが明らかとなっており、その機能の一つとして低分子化合物の細胞外輸送への寄与が挙げられる。この機能に着目し詳細に検討した結果、**L-PGDS** は疎水性の低分子化合物に可逆的に結合し、その溶解度を向上させることが明らかとなった。

本研究では、上記の **L-PGDS** の機能に着目し、医薬品剤形の中で最も汎用性の高い経口固形製剤開発における新規の可溶化剤としての応用を目指し、難溶性モデル化合物の可溶化、並びに固体状態の **L-PGDS** 可溶化製剤の物理化学的性質の評価、及び数種類のモデル動物を用いた *in vivo* 評価を行った。

## 第1章 **L-PGDS** 可溶化製剤の製造法検討および *in vitro* / *in vivo* 評価

降血圧作用を有するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるテルミサルタンを難水溶性モデル化合物として、**L-PGDS** を用いた新規な可溶型経口固形製剤の開発に関して検討を行った。**L-PGDS** は活性中心をアラニンに置換した変異型として、大腸菌を用いた組換えタンパク質発現システムにより必要量を得た。**L-PGDS** のテルミサルタンの溶解度に対する効果を評価するため、過剰量のテルミサルタンに既定量の **L-PGDS** を添加し 37°C で反応させ、テルミサルタンの溶解度の継時変化を測定した。その結果、**L-PGDS** を添加することでテルミサルタンの溶解度は劇的に向上することが明らかとなり、**pH 8.0** において **25 mg/mL L-PGDS** 溶液中でのテルミサルタンの溶解度は **L-PGDS** 非存在下の約 **35 倍** 上昇した。溶解度試験から得られた結果を元に、テルミサルタン/**L-PGDS** 複合体を調製し、噴霧乾燥法により固体状態の複合体を調製した。得られたテルミサルタン/**L-PGDS** 複合体顆粒に関して、**Simulated gastric fluid (pH 1.6)**, **McIlvaine buffer (pH 5.0)**, 及び **Phosphate buffer (pH 6.8)** を試験液として溶出試験を行い、*in vitro* における複合体からのテルミサルタンの溶出性を評価した。*In vitro* 溶出試験の結果、テルミサルタン/**L-PGDS** 複合体は評価した全ての試験液において **100%** の薬物溶出を示し、この結果から薬物/**L-PGDS** 複合体は生体内 **pH** 環境の変化に影響されず、均一な薬物溶出を行うことが示唆された。また、生体内における薬物/**L-PGDS** 複合体からの薬物放出プロファイルを検討するためそれぞれプロテアーゼを含んだ人工胃液、並びに人工腸液中での **L-PGDS** の消化実験を実施した。*In vitro* 消化実験の結果から、薬物/**L-PGDS** 複合体は胃内環境において **L-PGDS** はその構造を保持し複合体として腸内環境に移行した後、**L-PGDS** は速やかにプロテアーゼにより分解され、薬物を放出していることが推測された。さらに、生体内での複合体の挙動を評価するため、高血圧自然発症ラット (**SHR**) を用いて、複合体製剤投与後の血清中テルミサ

ルタン濃度の経時的推移 (**PK study**), 並びに降血圧作用の評価 (**PD study**) を実施し, 微粉碎テルミサルタン (**API**), 並びにテルミサルタンの溶解度改善技術が施されている上市品 (ミカルデイス®) も同様に試験を行い, 複合体製剤との比較を行った。**PK study** の結果から, テルミサルタン/**L-PGDS** 複合体は **API** の薬物動態学的 (**PK**) パラメータ (**AUC**, **C<sub>max</sub>**, 及び **T<sub>max</sub>**) を大きく改善する結果を示し, ミカルデイス®と比較しても **T<sub>max</sub>** の短縮が認められ **AUC** が改善する傾向を示した。また, **PD study** の結果に関して, 最大血圧抑制値に各製剤間に大きな差は認められなかった。しかし, テルミサルタン/**L-PGDS** 複合体, 及びミカルデイス®は **API** に比較し投与後速やかに血圧を抑制し, その効果は **API** が効果を示さない投与後 **48** 時間後においても持続する結果となり, 即効性, 及び持続性に関しては **PK study** の結果を支持した。以上の結果から, **L-PGDS** は非常に強力な経口固形製剤の可溶化剤として開発できることが示唆された。

## 第2章 L-PGDS を用いた難溶性化合物の pH 非依存性薬物放出型製剤の開発

第 1 章において得られた知見から, **L-PGDS** を用いた pH 非依存的な薬物放出を有する製剤の開発を pH 依存的な溶解度プロファイルを有した血栓形成を阻害するホスホジエステラーゼ阻害剤であるジピリダモールをモデル化合物として目指した。過剰量のジピリダモールに既定量の **L-PGDS** を添加する手法により, ジピリダモールの溶解度の変化を評価したところ, **37°C** 2 時間の反応において **25 mg/mL L-PGDS** 添加によって, **pH8.0** において **L-PGDS** 非存在下の約 **85** 倍の溶解度改善を示した。第 1 章で設定されたパラメータを用いて噴霧乾燥を行った結果, 高収率で固体状態のジピリダモール/**L-PGDS** 複合体を得た。得られた複合体は **Fasted state simulated gastric fluid (pH 1.6)**, 及び **Phosphate buffer (pH 6.8)** を試験液として用いた *in vitro* 溶出試験において **100%** の溶出を示し, テルミサルタン/**L-PGDS** 複合体処方と同様に生体内の pH 範囲で均一な溶出挙動を有していることが示唆された。さらに, ジピリダモールの期待された薬効が認められない低胃酸状態を示すオメプラゾール処理低胃酸モデルラットを用いて, 調製したジピリダモール/**L-PGDS** 複合体処方の *in vivo* での吸収挙動を評価した。その結果, **control** であるジピリダモール投与群は, 低胃酸モデルラットにおいて, オメプラゾール未処理ラットと比較して, **AUC** が **45%**, **C<sub>max</sub>** が **60%** となり, 胃酸分泌の減少に伴い胃内 pH が上昇した結果ジピリダモールの吸収が抑制されていた。一方, ジピリダモール/**L-PGDS** 複合体処方を投与したラット群では, 低胃酸モデルと通常ラットにおいてジピリダモールの **PK** パラメータに特異的な差は認められなかった。以上の結果から, pH 依存的な溶解度を有する薬物に対して **L-PGDS** を用いることにより, 臨床の場で起こり得る胃内 pH 環境に影響された予期せぬ薬効低下やバラつきを改善する pH 非依存的な薬物放出製剤の開発に成功した。

## 第 3 章 固体状態の薬物/**L-PGDS** 複合体製剤に関する安定性評価

噴霧乾燥により得られたジピリダモール/**L-PGDS** 複合体をモデル製剤として,

固体状態の薬物/L-PGDS 複合体製剤の安定性に関して数種類の異なる保存条件（5℃, 25℃/60% relative humidity (RH), 40℃/75% RH および 40℃/75% RH（開放条件））において 3 ヶ月保存を行い品質の経時的な変化を評価した。その結果、5℃, 3 ヶ月の保存では複合体処方是非常に安定であり、L-PGDS の凝集やジピリダモール含量の低下も認められなかった。一方、25℃/60% RH, 3 ヶ月保存後のサンプルにおいて、僅かな可溶性の凝集が認められ、40℃/75% RH, 及び 40℃/75% RH（開放条件）保存サンプルにおいては、保存後 1 ヶ月から可溶性の凝集、並びに不溶性の凝集体も認められた。pH6.8 の試験液を用いた溶出挙動の評価において、複合体を形成していないジピリダモールの分解や不溶性凝集の生成に伴うと予測される溶出プラトー値の低下を認めたが、初期の溶出速度や薬物の溶解維持などの溶出プロファイルに変化はなかった。全ての保存条件において、L-PGDS の立体構造に変化は認められず、L-PGDS 複合体の形成は維持されていたことが示唆された。以上の結果より、保存サンプルに認められた凝集体の生成メカニズムに関して、抑制方法も含め更なる検討が必要であるが複合体の形成維持の点においては安定的に維持されることが示された。

## 結論

本研究において、L-PGDS は難溶性化合物の溶解度、並びに臨床使用上問題となっている pH 依存的な溶解度プロファイルを改善し、またそれらの期待される薬物動態挙動が *in vivo* 試験系においても認められた。その調製法は極めて簡便であり、噴霧乾燥法により恒常的に製造されることが確認された。以上の結果より、難溶性化合物の経口固形製剤の開発において、本生体内タンパク質が非常に強力な可溶化剤となり得ることが判明した。

## 審査結果の要旨

医薬品の創薬研究戦略の変化に伴い、物理化学性質に問題を抱えた医薬品候補化合物が開発段階に増加している。特に、医薬品の溶解度に関して現在開発されている医薬品候補化合物は、約 90%が難溶性化合物であり、薬物の体内吸収のためには必ず薬物の溶解過程を経なければならないため、医薬品候補化合物の溶解度を改善することは開発段階において大きな課題となっている。これまで、難溶性化合物の溶解度改善に関して様々な手法が検討されているが、溶解度の向上と同時に多くの因子に関する検証が必要であり、より簡便な溶解技術の開発が求められている。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、中枢神経系に高発現し、ヒト脳脊髄液中においては、アルブミンに次いで 2 番目に多く存在

するタンパク質である。これまでの生化学的な研究により、**L-PGDS** の機能の一つとして疎水性低分子化合物の細胞外輸送への寄与が明らかとなっている。この機能を詳細に検討した結果、**L-PGDS** は、ヘム代謝産物やビタミン **A** 誘導体などの様々な疎水性低分子と可逆的に結合し、その溶解度を向上させることが報告されている。そこで、学位申請者は、上記 **L-PGDS** の機能に着目し、医薬品剤形の中で最も汎用性の高い経口固形製剤開発における新規の可溶化剤としての応用を目指した。

第 1 章では、降血圧作用を有するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるテルミサルタンを難水溶性モデル化合物として用い、**L-PGDS** による可溶型経口固形製剤の噴霧乾燥法を用いた製造法検討、および得られた製剤の物理化学性質を詳細に評価した。溶解度測定実験の結果、テルミサルタンの溶解度は **L-PGDS** の添加により、**L-PGDS** 非存在下の約 **35** 倍上昇した。また、噴霧乾燥により得られたテルミサルタン/**L-PGDS** 複合体顆粒は、*in vitro* 溶出試験の結果、生体内 pH 範囲において **100%** のテルミサルタンの溶出を示した。また、学位申請者は生体内におけるテルミサルタン/**L-PGDS** 複合体からの薬物放出プロファイルを検討するため、それぞれプロテアーゼを含んだ人工胃液、および人工腸液中での **L-PGDS** の消化実験を実施した。その結果、テルミサルタン/**L-PGDS** 複合体は、ペプシン存在下の胃内環境においてその構造を維持し、複合体として腸内環境に移行した後、**L-PGDS** は速やかにパンクレアチンに含まれるプロテアーゼにより分解され、薬物を放出していると考えた。さらに、生体内での複合体製剤の *in vivo* 挙動を評価するため、高血圧自然発症ラットを用いて、複合体製剤投与後の血清中テルミサルタン濃度の経時的推移、および降血圧作用の評価を実施した結果、薬物のみの投与群と比較して血清中薬物濃度プロファイル、および降圧持続作用を劇的に改善し、それは溶解度技術が施されている上市品と同様の結果であった。以上の結果から、学位申請者は **L-PGDS** を用いた難溶性化合物の可溶型固形製剤の開発を達成し、その薬物放出メカニズムは小腸内における速やかな **L-PGDS** の分解により放出されると考察した。

第 1 章において得られた知見を基に、第 2 章では pH 依存的な溶解度プロファイルを有する難水溶性薬剤であり、血栓形成を阻害するホスホジエステラーゼ阻害剤であるジピリダモールをモデル化合物として、**L-PGDS** を用いた pH 非依存的な薬物放出を可能にする製剤の開発を行った。調製したジピリダモール/**L-PGDS** 複合体製剤は、人工胃液、および pH6.8 試験液を用いた *in vitro* 溶出試験において **100%** の溶出を示し、生体内の pH 範囲で均一な溶出挙動を有していることが示された。さらに、ジピリダモールの期待された薬効が認められない低胃酸状態を示す低胃酸モデルラットを用いて、複合体製剤の *in vivo* での吸収挙動を評価した。その結果、control であるジピリダモール投与群は低胃酸モデルラットにおいて通常ラットと比較して吸収が抑制されていたのに対して、ジピリダモール/**L-PGDS** 複合体製剤を投与したラット群では、低胃酸モデルと通常ラットにおいて薬物動態パラメータに有意な差は認められなかった。以上

より、**L-PGDS** を用いることにより、**pH** 非依存的に薬物放出が可能な製剤の開発が達成された。

第 3 章では、噴霧乾燥により得られたジピリダモール/**L-PGDS** 複合体製剤をモデル製剤として、固体状態の薬物/**L-PGDS** 複合体製剤の安定性に関して数種類の異なる保存条件における経時的な品質変化を評価した。その結果、全ての保存条件において **L-PGDS** の立体構造に変化は認められず、**L-PGDS** 複合体の形成は維持されていることを明らかにした。

本申請論文は、**L-PGDS** による難溶性化合物の溶解度改善のみならず、臨床使用上問題となっている薬物の **pH** 依存的な溶解度プロファイルの改善効果を種々の *in vitro* 評価系、およびモデル動物を用いた詳細な実験により見出した。これらの知見は、**L-PGDS** が非常に強力な可溶化剤として、難溶性化合物の経口固形製剤開発において利用可能であることを証明するものであり、今後の医薬品開発を含めた薬学（製剤学）分野に大きく貢献するものである。よって、最終試験の結果と合わせて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。