

氏名 (生年月日) おがわ こうへい
小川 耕平 (1987年8月10日)

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 論博薬科 第3号

学位授与の日付 2023年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 ポリ乳酸-ポリエチレングリコールブロック共重合体ナノパーティクルの製剤特性解析ならびにナノパーティクルの体内動態及び血清耐性に及ぼす製剤特性の影響

論文審査委員 (主査) 教授 山本 昌

(副査) 教授 栄田 敏之

(副査) 教授 西口 工司

論文内容の要旨

序章 (はじめに)

近年、ナノパーティクル (NP) を用いた標的指向化ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が活発に行われているが、基礎研究や非臨床研究での優れた結果に対して、臨床試験、承認に至っているものは極めて少ない。その理由として、NP を用いた DDS は、低分子医薬品と比較し、その構造が複雑であり、品質評価が難しいことが挙げられる。NP の品質は、化学的特性 (化合物純度など)、物理的特性 (粒子径、表面電荷など)、微生物学的特性 (無菌性など) といった製剤特性を多面的に評価することで保証される。NP の医薬品としての開発においては、これらの製剤特性を研究段階や開発初期において体系的に評価し、開発する製剤への理解を深めることが規制当局から発刊されるガイダンスの中で推奨されている。また、製剤特性が薬物動態、有効性、安全性に及ぼす影響を考察し、製剤特性の制御範囲が広い製造法を構築することも推奨されている。しかしながら、現在までに、NP の製剤特性の体系的な評価系は構築されておらず、製剤特性と体内動態、有効性、安全性との関係性には不明な点が多いのが現状である。そこで著者は、複雑な NP 型の医薬品開発の課題解決を目指して、がん治療への応用が期待されているポリ乳酸-ポリエチレングリコールブロック共重合体 (PLA-PEG) NP の製剤特性を、種々の手法を用いて解析した。さらに、特性解析した NP の体内動態及び血清耐性を評価し、製剤特性との関係性の解明を試みた。

第1章 立体異性、結晶性の異なるポリ乳酸-ポリエチレングリコールブロック共重合体ナノパーティクル (PLA-PEG NP) の体内動態に及ぼす製剤特性の影響

PLA-PEG NP の原料特性及び製剤特性に及ぼす PLA-PEG ブロック共重合体の立体異性の影響について、粉末 X 線回折 (XRD)、サイズ排除クロマト-多角散乱検出 (SEC-MALS)、プロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$)、動的光散乱法 (DLS)、固相抽出法 (SPE) 等を用いて解析した。

その結果、D-lactide、L-lactide を基盤とする PLA-PEG (D-PEG、L-PEG) は、結晶性を示したが、DL-

lactide を基盤とする PLA-PEG (DL-PEG) は、非晶質様の構造を示した。さらに、D-PEG と L-PEG の等モル混合物は、stereocomplex と呼ばれる別の結晶型 (SC-PEG) を形成した。

また、立体異性の異なる PLA-PEG NP を DLS、SEC-MALS、¹H-NMR により解析することで、NP の構造的な特性値を算出した。その結果、SC-PEG NP は DL-PEG NP、L-PEG NP と比較し、表面 PEG 密度が 1.5~2.3 倍高いことを見出し、封入薬物 tamoxifen (TAM) の NP 表面への物理吸着量を 5~30% 低減することを明らかにした。本結果は、SC-PEG NP の高いコアの結晶性により、PEG 鎖が疎水コアに埋もれず、表面に配向したため、物理吸着量を低減したことによると推察された。

さらに、SC-PEG NP 及び NP に封入した TAM のマウス静脈内投与後の血漿中濃度—時間曲線下面積 (AUC) は、その表面 PEG 密度と表面への薬物吸着量を反映し、DL-PEG NP、L-PEG NP と比較し、1.3~4.0 倍高い値を示した。以上から、PLA-PEG NP の表面 PEG 密度と PLA の結晶性、表面吸着薬物量が PLA-PEG NP 及び TAM の体内動態を変動させる特性であることが示唆された。

第 2 章 Stereocomplex 形成 PLA-PEG ナノパーティクルの製剤特性及び体内動態に及ぼす良溶媒中のイオン強度と総流速の影響

SC-PEG NP の作製方法として、連続的貧溶媒析出法を選択し、良溶媒に溶解した PLA-PEG 及び TAM を貧溶媒である水と一定の流速で混合することにより、NP を作製した。また、作製時の工程パラメータとして一般的な温度、総流速に加え、製剤特性を制御する新たな工程パラメータとして、イオン性添加剤である臭化リチウム (LiBr) の良溶媒中濃度を設定した。

その結果、総流速が速く、LiBr 濃度が低いほど、NP の粒子径 (D_h) が小さくなることを明らかにし、 D_h と表面 PEG 密度には正の相関を認め、 D_h と表面 PEG 密度がトレードオフの関係となった。本結果は、 D_h の減少により NP の比表面積が増加することにより、表面 PEG 密度が減少していると推定された。さらに、LiBr の添加は、良溶媒中の SC-PEG の会合数を変化させることで NP の D_h を制御しており総流速と D_h に対して相反する作用のために、広範囲に D_h を制御できると考えられた。さらに、作製時の工程パラメータが異なる SC-PEG NP の体内動態を検討したところ、 D_h が大きく表面 PEG 密度の高い SC-PEG NP (D_h 105 nm, 表面 PEG 密度 16.6 分子/100nm²) において、異なる工程パラメータで作製した SC-PEG NP (D_h 61 nm, 表面 PEG 密度 7.90 分子/100nm²) に比べ、AUC が 50% 増加し、肝臓への分布が 30% 低減されることを確認した。以上、工程パラメータが SC-PEG NP の D_h と表面 PEG 密度に影響し、その血中滞留性、組織移行性が変動することを示した。

第 3 章 骨指向性 PLA-PEG ナノパーティクルの設計ならびに表面特性制御による保存安定性及び血清耐性の改善

骨指向性能動標的指向型 NP の設計の指標として、生体内での標的化素子の結合活性の低減や NP の全身クリアランスが増大することが報告されているプロテインコロナに着目した。プロテインコロナは NP の周囲に生体中のタンパク質が結合する現象であり、規制当局から発刊されているガイドライン中でもその評価が推奨されている。本章では、新規骨標的化素子の開発を目的に骨標的化素子であるオクタアスパラギン酸 (D8) の誘導体化を試みた。また、NP の特性解析に標的化素子の構造的解析を組み合わせることで、プロテインコロナの形成に及ぼす製剤特性の影響を解析した。さらに、医薬品として重要な保存安定性に及ぼす設計した標的化素子の影響についても評価した。

その結果、D8 のアニオン誘導体と双性イオン誘導体を作製し、それぞれを修飾した NP の構造パラメータを解析したところ、標的化素子ペプチドは、NP の表面を完全に覆うまで修飾されることが認め

られた。双性イオン誘導体を修飾した NP (NP_{Zwi}) では、14~42 mol%までの修飾率において、保存中に NP の凝集を認めたと、表面を完全に被覆修飾した 70 mol%の NP_{Zwi} では保存中に凝集を認めなかった。さらに、NP_{Zwi} はアニオン性誘導体を修飾した NP (NP_{Ani}) と比較して、血清存在下においてプロテインコロナの形成を 30%低減させ、骨形成成分であるハイドロキシアパタイト (HAP) への血清存在下における結合活性の低下を有意に抑制した。本結果は、双性イオン化による強固な NP 表面での水素結合形成がタンパク質との相互作用を抑制し、標的への親和性を維持したものと考察された。以上より、標的指向化素子の双性イオン化が血清存在下における HAP に対する結合活性の維持に有用であることを示し、その表面密度が保存安定性を改善することを明らかとした。

総括

以上、3 章にわたり、詳細な特性解析手法に基づき、PLA-PEG NP の製剤特性に基づいた製剤設計とその体内動態、血清耐性との関係性を明らかにした。すなわち、PLA-PEG NP の原料特性、製剤特性を詳細に解析し、表面 PEG 密度や薬物の封入状態がその体内動態に影響を及ぼすことを示した。また、良溶媒中への LiBr の添加は、PLA-PEG NP の製剤特性と体内動態を改善可能であり、製剤特性の制御範囲が広い製法となることを示した。さらに、能動ターゲット型型の PLA-PEG NP の製剤設計では、標的化素子の双性イオン化と PLA-PEG NP 表面での修飾密度が PC の形成ならびに PLA-PEG NP の保存安定性に重要であることを示した。本研究の結果は、複雑な構造を持つ NP を用いた医薬品開発に対して、有益な基礎的情報を提供するものと考えられる。

審査の結果の要旨

【緒言】

近年、ナノパーティクル (NP) を用いた標的指向化ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が活発に行われているが、臨床試験、承認に至っているものは極めて少ない。その理由として、NP を用いた DDS は、低分子医薬品と比較し、その構造が複雑であり、品質評価が難しいことが挙げられる。そこで著者は、ポリ乳酸-ポリエチレングリコールブロック共重合体 (PLA-PEG) NP の製剤特性を、種々の手法を用いて解析した。さらに、特性解析した NP の体内動態及び血清耐性を評価し、製剤特性との関係性の解明を試みた。

【審査結果の要旨】

第 1 章では、PLA-PEG NP の原料特性及び製剤特性に及ぼす PLA-PEG ブロック共重合体の立体異性の影響について、種々の手法を用いて解析した。その結果、D-lactide、L-lactide を基盤とする PLA-PEG (D-PEG、L-PEG) は、結晶性を示したが、DL-lactide を基盤とする PLA-PEG (DL-PEG) は、非晶質様の構造を示した。一方、D-PEG と L-PEG の等モル混合物は、stereocomplex と呼ばれる別の結晶型 (SC-PEG) を形成した。

また、SC-PEG NP の表面 PEG 密度は、DL-PEG NP、L-PEG NP と比較し、1.5~2.3 倍高いことを見出し、封入薬物 tamoxifen (TAM) の NP 表面への物理吸着量を 5~30%低減することを明らかにした。さらに、SC-PEG NP 及び NP に封入した TAM マウス静脈内投与後の血漿中濃度-時間曲線下面積

(AUC) は、DL-PEG NP、L-PEG NP と比較し、1.3~4.0 倍高い値を示した。

次に、第2章では、SC-PEG NP の作製時の新たな工程パラメータとして臭化リチウム (LiBr) の良溶媒中濃度を設定した。その結果、総流速が速く、LiBr 濃度が低いほど、NP の粒子径 (D_h) が小さくなることを明らかにし、 D_h と表面 PEG 密度には正の相関を認め、 D_h と表面 PEG 密度がトレードオフの関係となった。また、LiBr の添加は、良溶媒中の SC-PEG の会合数を変化させることで NP の D_h を制御しており総流速と D_h に対して相反する作用により、広範囲に D_h を制御できると考えられた。さらに、 D_h が大きく表面 PEG 密度の高い SC-PEG NP の静脈内投与後の AUC は、他の工程パラメータで作製した SC-PEG NP に比べ 50%増加すると共に、肝臓への分布が 30%低減されることを確認した。

最後に第3章では、骨標的化素子であるオクタアスパラギン酸 (D8) の誘導体化を試み、D8 のアニオン誘導体と双性イオン誘導体を作製し、それぞれを修飾した NP の構造パラメータを解析した。その結果、双性イオン誘導体を修飾した NP では、14~42 mol%までの修飾率において、保管中に NP の凝集を認めたが、表面を完全に被覆修飾した 70 mol%の NP では保管中に凝集を認めなかった。さらに、双性イオン誘導体を修飾した NP はアニオン性誘導体を修飾した NP と比較して、血清存在下においてプロテインコロナの形成を 30%低減させ、骨形成成分であるヒドロキシアパタイトへの血清存在下における結合活性の低下を有意に抑制した。

【結論】

以上、3章にわたり、詳細な特性解析手法に基づき、PLA-PEG NP の製剤特性に基づいた製剤設計とその体内動態、血清耐性との関係性を明らかにした。本研究の結果は、複雑な構造を持つ NP を用いた医薬品開発に対して、有益な基礎的情報を提供するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬科学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。