

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

2022 年

小川 耕平

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。論文の転載については出版社より許可を得ている。

1. Kohei Ogawa, Hidemasa Katsumi, Kazuyuki Takata, Daiki Nomura, Yasushi Moroto, Hideyuki Kitamura, Chise Takaki, Masaki Morishita, Akira Yamamoto. Orthogonal characterization and pharmacokinetic studies of polylactide-polyethyleneglycol polymeric nanoparticles with different physicochemical properties. *Int. J. Pharm.* **2021**, 608, 121120. [第 1 章]
2. Kohei Ogawa, Hidemasa Katsumi, Yasushi Moroto, Masaki Morishita, Akira Yamamoto. Processing parameters and ion excipients affect the physicochemical characteristics of the stereocomplex-formed polylactide-b-polyethylene glycol nanoparticles and their pharmacokinetics. *Pharmaceutics*. **2022**, 14, 568. [第 2 章]
3. Kohei Ogawa, Hidemasa Katsumi, Daiki Nomura, Yasushi Moroto, Masaki Morishita, Akira Yamamoto. A dense layer of polyethyleneglycol and zwitterionic bone targeting peptide on the surface of stereocomplex polylactide-polyethyleneglycol nanoparticles improves shelf-storage stability and the serum compatibility. *J. Pharm. Sci.* **2022**, 111, 2888-2897. [第 3 章]

目次	
略語一覧.....	1
要旨	2
序論	5
本論	8
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	
1.1 緒言.....	8
1.2 結果	
1.2.1 PLA-PEG の合成と特性解析	9
1.2.2 PLA-PEG NP の調製と特性解析	12
1.2.3 PLA-PEG NP の血漿中 Pharmacokinetics (PK) プロファイル	22
1.3 考察	
1.3.1 PLA-PEG の原料特性解析	24
1.3.2 PLA-PEG NP の構造に及ぼす PLA-PEG の立体異性の影響.....	24
1.3.3 PLA-PEG NP の表面 PEG 密度.....	25
1.3.4 PLA-PEG NP 中における TAM の局在に及ぼす PLA-PEG NP の物理化学的特性の影響	26
1.3.5 PLA-PEG NP の PK プロファイルに及ぼす製剤特性の影響	27
1.4 小括.....	28
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	
2.1 緒言.....	29
2.2 結果	
2.2.1 PDLA-PEG と PLLA-PEG の合成と特性解析.....	30
2.2.2 異なる温度で作製した SC-PEG NP の製剤特性.....	32
2.2.3 異なる LiBr 濃度を含有する良溶媒中での SC-PEG のコンフォメーション.....	33
2.2.4 異なる LiBr 濃度／TFR により調製した TAM 搭載 SC-PEG NP の特性解析	34
2.2.5 異なる工程パラメータにより作製した異なる表面 PEG 密度と D_h を有する SC-PEG NP の血漿中 PK プロファイルと組織中分布	39
2.3 考察	

2.3.1 SC-PEG NP の製剤特性に及ぼす調製温度の影響	41
2.3.2 LiBr 濃度と TFR の制御による SC-PEG NP の製剤特性変動	41
2.3.3 異なる工程パラメータで作製した SC-PEG NP の PK プロファイル, 組織分布	43
2.4 小括	44
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	
3.1 緒言	46
3.2 結果	
3.2.1 PLA-PEG-Maleimide (PDLA-PEG-Mal ならびに PLLA-PEG-Mal) と PLA ホモポリマー (PDLA ならびに PLLA) の合成	47
3.2.2 SC-PEG NP の製剤特性に及ぼす PLA ホモポリマー添加の影響	48
3.2.3 NP _{PLA/PLA-PEG} 表面への骨標的化ペプチド素子修飾量	51
3.2.4 骨標的化ペプチド素子修飾 NP _{PLA/PLA-PEG} の構造解析	52
3.2.5 骨標的化ペプチド素子修飾前後の安定性ならびに保存安定性	53
3.2.6 骨標的化ペプチド素子修飾 NP のプロテインコロナの形成評価と血清中での TAM の放出	55
3.2.7 血清を含む媒体中での HAP への骨標的化ペプチド素子修飾 NP の結合活性	57
3.3 考察	
3.3.1 SC-PEG NP への stereocomplex 形成 PLA ホモポリマーの添加	59
3.3.2 骨標的素子を修飾した SC-PEG NP の物理化学的及び構造パラメータと保存安定性	60
3.3.3 血清中における NP へのプロテインコロナの形成と HAP への結合活性	61
3.4 小括	62
結論	64
第 1 章 実験の部	65
第 2 章 実験の部	74
第 3 章 実験の部	77
謝辞	84
参考文献	85

略語一覽

NP:	Nanoparticle
PLA-PEG:	Poly(lactide)-poly(ethylene glycol) block copolymer
DL-PEG:	DL-lactide based PLA-PEG
D-PEG:	D-lactide based PLA-PEG
L-PEG:	L-lactide based PLA-PEG
SC-PEG:	Equimolar mixture of D-lactide based PLA-PEG and L-lactide based PLA-PEG
TAM:	Tamoxifen
DLS:	Dynamic light scattering
SEC:	Size exclusion chromatography
MALS:	Multi-angle light scattering
RI:	Refractive index
¹ H-NMR:	Proton nuclear magnetic resonance
SPE:	Solid phase extraction
HPLC:	High-performance liquid chromatography
UPLC:	Ultra-performance liquid chromatography
XRD:	X-ray diffraction
CD:	Circular dichroism
EE:	Encapsulation efficiency
DLC:	Drug loading content
D _h :	Hydrodynamic diameter
R _h :	Hydrodynamic radii
R _g :	Radii of gyration
PdI/PdI _{NP} :	Polydispersity index of nanoparticle
PdI _{uni} :	Polydispersity index of block copolymer
ZP:	Zeta-potential
PK:	Pharmacokinetics
AUC:	Area under the blood normalized concentration-time curve
T _{1/2} :	Half-life
C _{tot} :	Total clearance

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ー多角散乱検出 (SEC-MALS)、プロトン核磁気共鳴スペクトル (^1H -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のより、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 の凝集を認めたが、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、能動ターゲティング型の 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。

序論

近年、新薬の創薬難易度は上昇を続け、日本製薬工業協会の調べによると、2014 年～2018 年における新薬発売の成功確率は 22,407 分の 1 と低値を示している。さらに、国内製薬企業 10 社の平均研究開発費は 1,517 億円に上っており、年々その額は増大している。昨今では、低分子医薬品だけでなく、抗体医薬品、核酸医薬品、ウイルス、細胞などのニューモダリティに創薬の手段が拡充しており、今後さらなる研究開発費の増大が見込まれている。(1) このような背景の中で、昨今の Covid-19 パンデミックにおいても、核酸医薬品であるメッセンジャーRNA (mRNA) を脂質ナノ粒子に封入した mRNA ワクチン (2, 3) や、スパイクタンパク質の一次配列を改変し、界面活性剤と複合化することで免疫原性を高めた組み換えワクチン (4) など低分子化合物からニューモダリティへの創薬手段のパラダイムシフトが起こっている。これらの医薬品には、ドラッグデリバリーシステム (DDS) が活用されており、DDS には、創薬確率の向上ならびにニューモダリティの医薬品としての適応という点で大きな期待が寄せられている。

DDS は、①標的指向化、②経粘膜吸収促進／投与経路変更、③持続化 に大分される。(5) これらは独立しておらず、互いに複合化しながら、薬剤の治療域の拡大に貢献する。標的指向化 DDS においては、その組織選択性の観点から注目が集まっており、固形がんをはじめとして様々な疾患に応用されている。(6-8) これら DDS 技術の中で、ナノパーティクル (NP) は、その物理化学的な性質を利用して、体内動態を改善することで治療域を拡大している。特に生体適合性の高い NP を用いた標的指向化 DDS は、注目を集めており、リポソームや、脂質ナノ粒子、生分解性高分子型 NP などが該当する。これらは製薬産業界において、実用化されているものも存在しており、多くの臨床試験が実施されている。(9, 10) 標的指向化 DDS は次の 2 つに分類される。NP の血中滞留性の向上により、enhanced permeability and retention (EPR) 効果を利用して、主にがんを標的化する受動的標的指向化 (passive targeting) ならびに、標的指向化素子を NP の表面に修飾し標的組織へ薬物の送達を達成する能動的標的指向化 (active targeting) である。(5) これまでに、多くの基礎的研究ならびに非臨床試験において、標的指向化 DDS の良好な治療域の拡大が報告されている。(11) しかしながら、それにも関わらず、承認され実用化に至っているものの数はその検討数に比べて少数である。この要因として、近年種々の要因が考察されている。その一例は、非臨床試験からヒト臨床試験へのトランスレーションである。例えば、固形がんにおいては、非臨床モデルとして汎用されるマウス皮下移植モデルにおいて、その増殖速度がヒトに比べて速い点が指摘されている。(12) また、EPR 効果に関しても、ヒトと非臨床モデルの違いや、その外挿性に関する考察がなされている。(12, 13)

他方、医薬品としての製造、品質管理においても高い障壁が存在している。このような標的指向型 DDS 製剤は通常の低分子医薬品に比べて複雑であり、その品質は、多面的な評価手法により定義される。NP を含む製剤は、低分子医薬品においても評価される含量や純度といった化学的特性ならびに、無菌性などの微生物学的特性に加えて、粒子径や封入率、放

出性といった物理化学的特性の評価が特に重要である。これらの NP の特性を総称して製剤特性と呼ぶ。(14) さらには、これらの特性値を再現性良く製造できる製造法の確立も必要となる。しかしながら、このような DDS 製剤の基礎的研究及び非臨床研究では、その有効性や安全性の拡大に焦点が当てられ、製剤特性の評価や製造法については、十分な報告がなされていない。NP を含む製剤に限らず、医薬品の開発という観点においては、有効性ならびに安全性に影響を及ぼす製剤特性を重要品質特性 (CQA) として同定し、目標製品プロファイルを達成するために、製造工程とともに管理し、再現性が高く、制御範囲の広い製造プロセスを構築することがガイドラインで要求されている。(14) こうした規制面からの NP 型 DDS の開発推進を目的として、各国規制当局から NP を含む DDS 製剤に関するガイドライン、リフレクションペーパーが発刊されている。(15-17) これらのガイドラインの中では、NP 型製剤の特性解析を通じて、開発段階から、開発製剤への理解を深めることが推奨されている。製剤特性を理解するためには、NP を構成する原材料の特性解析も含んだ体系的な特性解析手法が必要であるが、その評価手法はまだまだ確立されているとは言い難い。また、製造方法の再現性、制御範囲の広い工程パラメータ設定という観点においても、作製した製剤の製剤特性に与える影響を評価し、工程パラメータを設定することが重要である。さらに、血清中での NP の特性変化 (血清耐性) についても評価することも要求されている。すなわち、プロテインコロナと呼ばれる NP 周辺への血清タンパク質の吸着挙動や、薬物の血清中での放出性などを評価し、生体内での挙動に関して理解し、その特性を制御することが推奨される。

このような背景から、NP 型 DDS 製剤の製剤特性やそれらを構成する原材料を体系的に評価可能な特性解析手法を確立すること、製剤特性が制御可能な製造法を確立することならびに製剤特性が薬物動態、有効性ならびに安全性に及ぼす影響を評価することが NP 型 DDS 製剤の医薬品開発において重要な検証項目となっているが、このような観点での NP 型 DDS 製剤の研究は不十分である。

そこで著者は近年、開発が活発に行われている高分子型 NP として、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 に着目した。PLA-PEG NP は、paclitaxel を内包した Genexol-PM[®] として、韓国、ヨーロッパで上市されており、米国においても、paclitaxel の可溶化製剤である Abraxane[®] に対する生物学的同等性評価による申請がなされている。(18) さらに、PLA-PEG NP は、現在複数の臨床試験が実施されており、様々な抗がん剤を内包した passive targeting 型製剤ならびに active targeting 型製剤の両方において開発がなされている。(19, 20) 先述の通り、このような複雑な製剤は、製剤特性の詳細な解析手法の確立が規制科学上、大きな課題である。さらに、体内動態や血清耐性などに影響を及ぼす製剤特性を同定し、安定な製剤処方や製剤特性を制御可能な製造方法を確立する必要がある。こうした課題に対して、著者は、PLA-PEG NP の製剤特性解析手法の確立と製剤特性が体内動態や血清耐性に及ぼす影響に焦点を当て検討を行った。がんを標的とすることを目的に PLA-PEG NP に抗がん剤である選択的エストロゲン受容体モジュレータ tamoxifen (TAM) を封入し、NP の作製を試みた。

第1章では、PLA-PEGブロック共重合体の原料特性について、従来から汎用されているプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$) やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC-RI) に加えて、PLA-PEGの結晶性、高次構造を評価するために、粉末X線回折 (XRD) ならびに円偏光二色スペクトル (CD) を用いることで、物理化学的な原料特性の詳細な解析を試みた。さらに、これらの物理化学的な原料特性がNPの製剤特性に及ぼす影響を動的光散乱 (DLS) やレーザードップラー法を用いたゼータ電位算出、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた封入率算出といった汎用される方法を用いて解析した。加えて、SEC-多角散乱検出 (MALS) やNPの $^1\text{H-NMR}$ を用いた解析ならびに固相抽出を組み合わせることで、NPの物理化学的特性について詳細な解析を行った。そして、製剤特性の異なるPLA-PEG NPの体内動態を調査した。第2章では、第1章で解析した製剤特性の制御域の広い製法の確立を目的に、新たな制御手法として良溶媒中へのイオン性添加剤の添加を検討した。PLA-PEG NPの作製法に関して、連続的貧溶媒析出法を選択し、工程パラメータである温度、総流速に加えて、新たな工程パラメータとして、良溶媒中のイオン濃度がPLA-PEG NPの製剤特性に及ぼす影響を解析した。さらに、作製時の工程パラメータの異なるPLA-PEG NPの体内動態に及ぼす製剤特性の影響を解析した。第3章では、骨指向性 active targeting 型 PLA-PEG NP の設計に関して、血清耐性と安定性に及ぼす製剤特性として、NPの表面特性ならびに骨標的指向化素子の双性イオン化について検討した。標的化素子の修飾数を超高速液体クロマトグラフ (UPLC) で定量し、構造パラメータを算出した。骨標的化素子を修飾したPLA-PEG NPの血清耐性、プロテインコロナの形成および保存安定性に及ぼす構造パラメータならびに製剤特性の影響について解析した。以下三章にわたり、検証結果を論述する。

本論

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

1.1 緒言

PLA-PEG ブロック共重合体 (PLA-PEG) は、水中において PLA ドメインが疎水性相互作用により自己会合し、PEG ドメインが PLA-水界面に配向することで NP を形成する。PLA-PEG の合成に関しても、PEG を開始剤として、lactide を開環重合させることにより、合成可能である。そのため、PLA ドメインの分子量制御が容易であり、これまでに多くの PLA-PEG NP に関する報告がなされている。(21, 22) 医薬品として、PLA-PEG NP を捉えた場合、欧州医薬品庁 (EMA) に承認されており、多くの臨床試験が現在も実施されている。(19) 臨床試験の中では、PLA-PEG ならびに PLA-PEG NP の高い生体適合性及び生分解性、低い免疫刺激性及びヒトにおける高い忍容性が確認されている。(20, 23) PLA-PEG NP は、EPR 効果を利用した *passive targeting* 及び PLA-PEG NP の表面に標的化素子を結合した *active targeting* での応用が期待されている。(24) 特に、*passive targeting* においては、NP の粒子径や表面特性を改変することにより、血中滞留性を向上させることで、がん組織への移行量が增大することが報告されている。(25-27)

一方、PLA-PEG を構成する PLA は、高分子として特徴的な性質を示すことが知られている。PLA の構成要素である乳酸の無水物である lactide の構造を Figure 1 に示す。Lactide はその分子内に不斉炭素を有していることから、DL-lactide、D-lactide、L-lactide の3種類の立体異性体が存在する。DL-lactide から構成される PLA (PDLLA) は非晶質様なランダムコイル状の構造を示し、D-lactide から構成される PLA (PDLA) ならびに L-lactide から構成される PLA (PLLA) は結晶性を示し、らせん状の構造を形成していることが報告されている。(22, 28) さらに、PDLA と PLLA の等モル混合物は、*stereocomplex* と呼ばれる熱力学的に安定な別の結晶形を示す複合体を形成する。こうした PLA の特徴的な性質を利用した立体の異なる PLA-PEG NP がこれまでも報告されているが、PLA-PEG の原料特性と NP の製剤特性に関して *in vitro* のみの評価に止まっているものが多数であり、生体内での挙動を調査している報告は極めて少ない。(28-31) また、PLA-PEG NP の立体異性体の違いを系統的に *in vivo* において比較検討した報告も確認できていない。

序論にて述べた通り、PLA-PEG NP のような複雑な医薬品の特性解析は極めて重要である。これまで、基礎研究における NP の評価は、DLS やレーザードップラー法を用いて、粒子径 (流体力学径、 D_h) やゼータ電位を測定し、物性に対して考察することが一般的であった。例えば、PEG を親水基に持つ NP は、ゼータ電位が中性を示すことを確認することで、表面が PEG で被覆されていることを考察できる。この PEG の NP 表面の被覆は、*passive targeting* において、非特異的な生体成分との相互作用を低減し、細網内皮系 (RES) が豊富

に存在する肝臓や脾臓といった組織への移行を低減させることで、NPの血中からの消失を抑制する。(32-34) しかしながら、近年、ゼータ電位が血中滞留性やRES組織への移行性を予測する指標としては不十分である可能性が示されている。(35) また、組織へ移行した後の組織内拡散性も重要な特性であることが報告されているが、ゼータ電位のみでは十分に予測できない。(36) このように、従来の製剤特性評価法のみでは、NPの生体内での挙動を捉えることが困難である。

そこで、著者は、立体異性と分子量が異なるPLA-PEGを開環重合法により合成し、それらの結晶性、高次構造に関する原料特性を解析した。さらに、合成したPLA-PEGを用いて、貧溶媒析出法によりPLA-PEG NPを作製し、従来のNPの評価手法であるDLS、レーザードップラーに加えて、SEC-MALS (37, 38) や¹H-NMR (34) を組み合わせることにより、NPの構造的特性(会合数、回転半径、表面PEG含量、密度)を算出した。さらに、近年、NPの封入率評価において、検討されている固相抽出(39-42)を適応し、NPへのTAMの封入状態を解析した。また、特性解析したTAMを搭載した立体の異なるPLA-PEG NPの体内動態をPLA-PEGとTAMをそれぞれ別の放射性核種で標識することにより、NPとTAMの体内動態を分離して評価し、これらの体内動態に及ぼす製剤特性の影響について考察した。本章では、PLA-PEGの原料特性とPLA-PEG NPの製剤特性の関係性を解明し、体内動態に及ぼす影響を解析した。

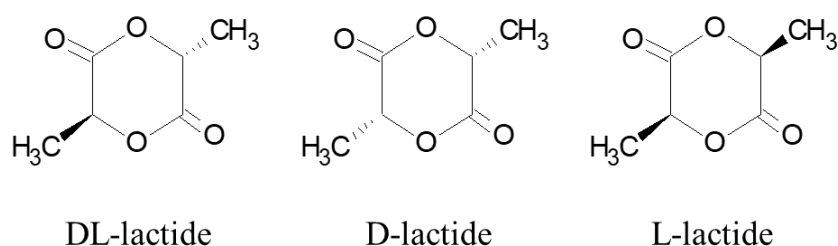


Figure 1 Chemical structures of lactide

1.2 結果

1.2.1 PLA-PEGの合成と特性解析

Table 1 に合成した PLA-PEG の個数平均分子量 (M_n) と相対分子量から算出した多分散性指数 (PdI_{uni}) を示す。いずれの合成した PLA-PEG も理論通りの分子量を示した。 PdI_{uni} は 2 以下となり、単一な分布を持つことが明らかとなった。Figure 2 に ¹H-NMR の典型例を示す。示したケミカルシフトについて、Figure 2 に記載の通りに帰属し、分子量を決定した。Figure 3 には、SEC-RI のクロマトグラムを示す。いずれの PLA-PEG も単一なクロマトグラムを示した。

本章において、PLA の分子量が 5 kDa 付近の PLA-PEG については、DL-体から構成される PLA-PEG は DL-PEG 5k-5k、D-体から構成される PLA-PEG は D-PEG 5k-5k、L-体から構成される PLA-PEG は L-PEG 5k-5k と表記し、PLA の分子量が 12 kDa 付近の PLA-PEG については、DL-体から構成される PLA-PEG は DL-PEG 12k-5k、D-体から構成され

る PLA-PEG は D-PEG 12k-5k、L-体から構成される PLA-PEG は L-PEG 12k-5k と表記した。

Table 1 Number-based molecular weight (M_n) of synthesized PLA-PEG

Isomer	PLA-PEG 5k-5k		PLA-PEG 12k-5k	
	M_n^a	PdI_{uni}^b	M_n^a	PdI_{uni}^b
DL-lactide	5186-5000	1.40	11411-5000	1.80
D-lactide	5745-5000	1.50	11769-5000	1.88
L-lactide	5140-5000	1.69	13037-5000	1.92

a: M_n calculated by 1H -NMR, b: PdI_{uni} calculated by SEC-RI

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Table1)

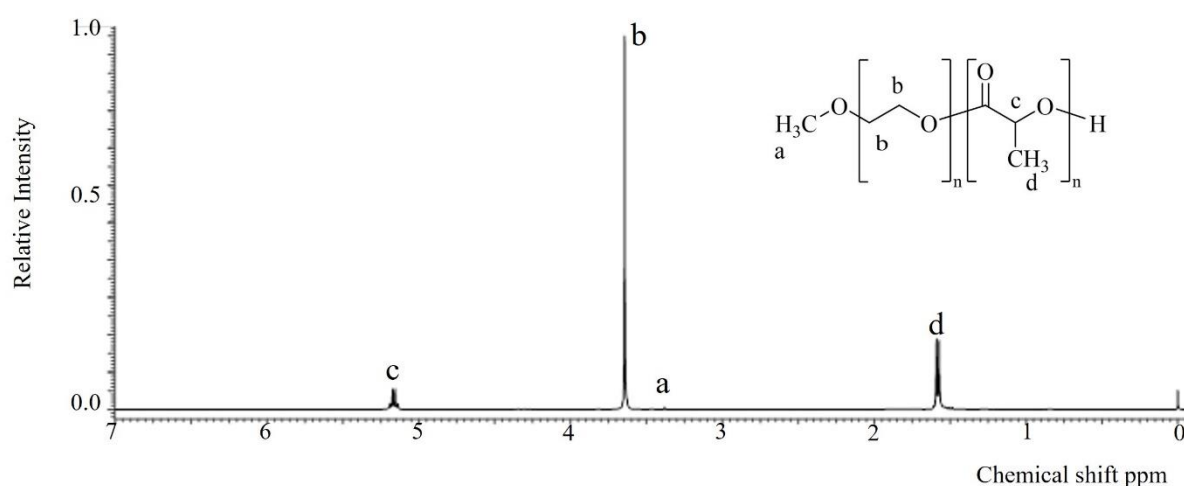


Figure 2 Typical 1H -NMR spectra of the synthesized PLA-PEG. The following chemical shifts were assigned: (a) 3.31 ppm, CH_3O of methoxy polyethyleneglycol; (b) 3.64 ppm, $(CH_2-CH_2-O)_n$ of methoxy polyethyleneglycol; (c) 5.18 ppm, CH of polylactide; and (d) 1.60 ppm, CH_3 of polylactide.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure S1)

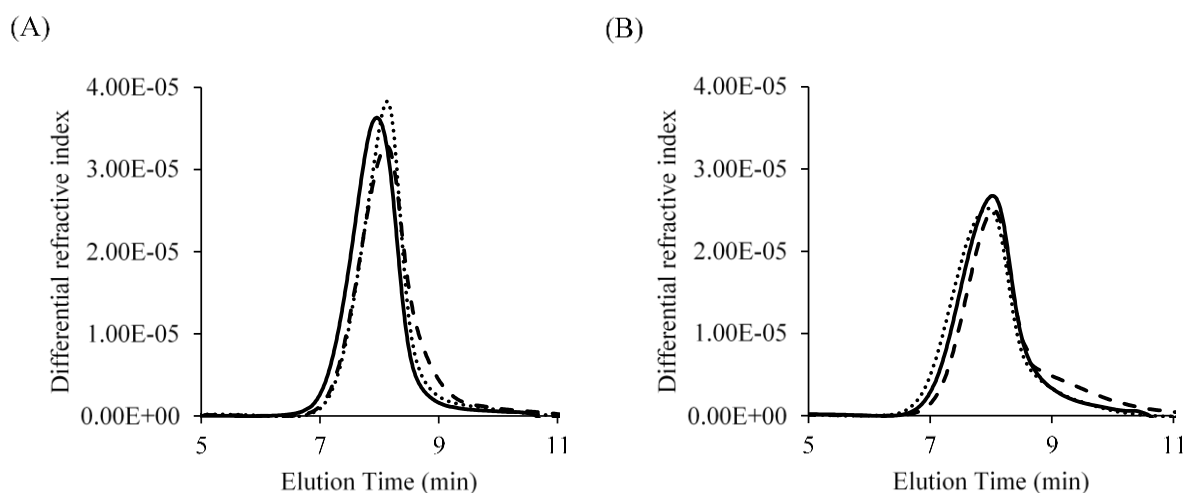


Figure 3 Size exclusion chromatography-refractive index chromatograms of (A) PLA-PEG 5k-5k and (B) PLA-PEG 5k-5k. The solid, dotted, and dashed lines indicate DL-PEG, D-PEG, and L-PEG, respectively, in both figures.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure S3)

Figure 4 に合成した PLA-PEG の粉末 X 線回折 (XRD) スペクトルを示す。分子量の異なるそれぞれの PLA-PEG について、XRD を用いて結晶性を評価した。mPEG 5 kDa は固体状態で結晶性を示す高分子であり、mPEG 5 kDa に由来する回折ピークが $2\theta = 19^\circ$ ならびに 24° 付近に観測された。DL-PEG 5k-5k ならびに DL-PEG 12k-5k では、PLA に由来する回折ピークは観察されなかった。一方で、D-PEG 5k-5k ならびに D-PEG 12k-5k、L-PEG 5k-5k ならびに L-PEG 12k-5k では、 $2\theta = 17^\circ$ 付近に PLA に由来する回折ピークを認め、PLA 部分が結晶化していることが確認された。さらに、D-PEG 5k-5k と L-PEG 5k-5k もしくは、D-PEG 12k-5k と L-PEG 12k-5k を等モルで混合した場合、その分子量に依らず混合前に認められていた $2\theta = 17^\circ$ 付近のピークが消失し、 $2\theta = 12^\circ$ 、 21° 付近に stereocomplex の形成に起因すると推定される回折ピークを認めた。

Figure 5 には、合成した PLA-PEG の円偏光二色性 (CD) スペクトルを示す。DL-PEG 5k-5k ならびに DL-PEG 12k-5k ではいずれもコットン効果を示さなかった一方で、D-PEG 5k-5k、D-PEG 12k-5k ならびに L-PEG 5k-5k、L-PEG 12k-5k においては、いずれの分子量においても、210 nm 付近にそれぞれ負と正のコットン効果を示した。また、分子量が異なる場合でも、コットン効果の振幅は同一であった。

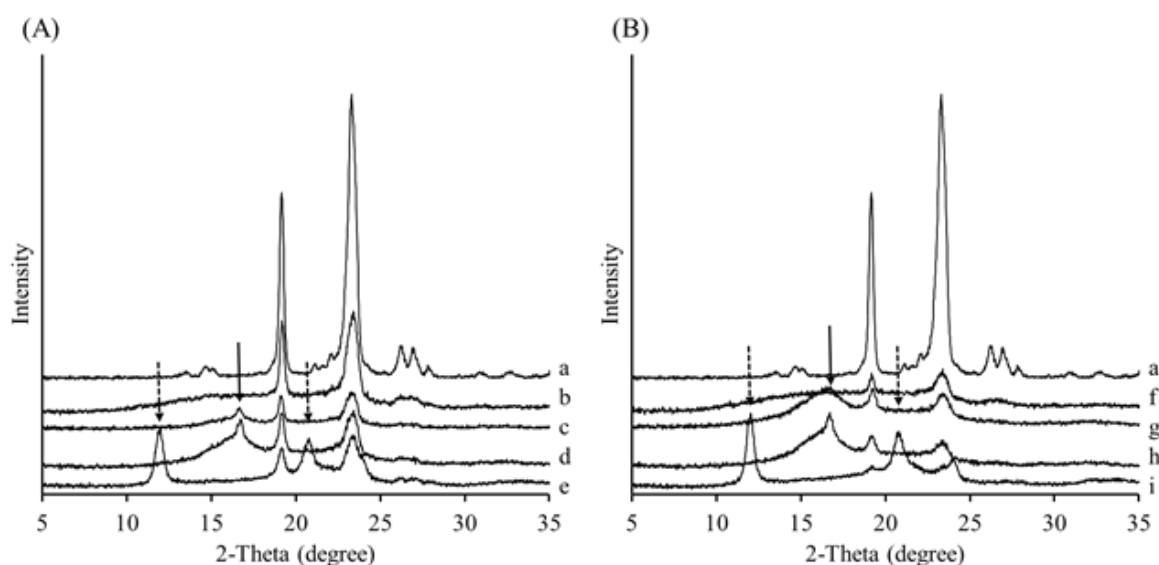


Figure 4 X-ray diffraction spectra of (A) PLA-PEG 5k-5k and (B) PLA-PEG 5k-12k. The lowercase letters indicate the following samples: a: mPEG 5k, b: DL-PEG 5k-5k, c: D-PEG 5k-5k, d: L-PEG 5k-5k, e: equimolar mixture of D-PEG 5k-5k and L-PEG 5k-5k, f: DL-PEG 12k-5k, g: D-PEG 12k-5k, h: L-PEG 12k-5k, and i: equimolar mixture of D-PEG 12k-5k and L-PEG 12k-5k (Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure 1)

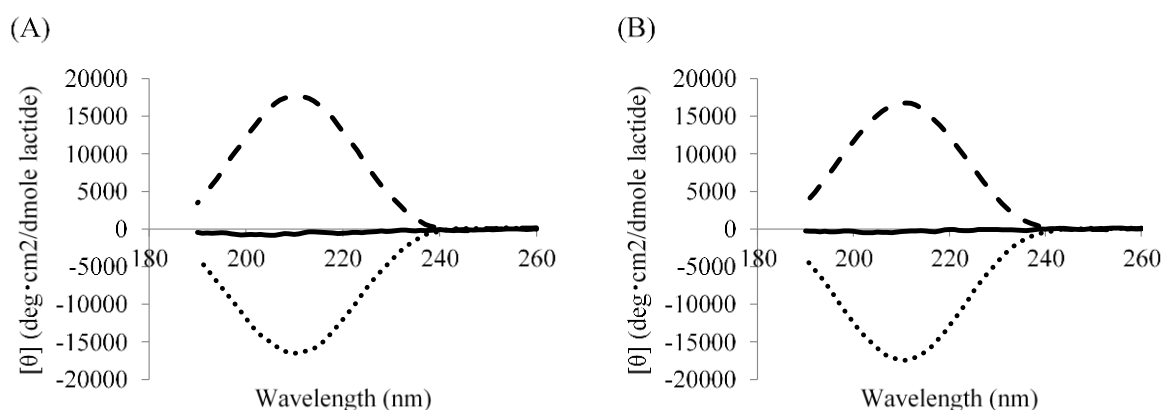


Figure 5 Circular dichroism (CD) spectra of (A) PLA-PEG 5k-5k and (B) PLA-PEG 12k-5k. The solid, dotted, and dashed lines indicate DL-PEG, D-PEG, and L-PEG, respectively, in both figures. (Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure S4)

1.2.2 PLA-PEG NP の調製と特性解析

本章において、DL-体から構成される PLA-PEG NP は DL-PEG NP、L-体から構成される PLA-PEG NP は L-PEG NP、stereocomplex を形成する PLA-PEG NP は SC-PEG NP と表記する。作製に用いた PLA-PEG の分子量については、末尾に 5k-5k または 12k-5k と表記した。

1.2.2.1 封入率 ならびに薬物搭載量

Figure 6 に調製した PLA-PEG NP の封入率 (Figure 6A) と薬物搭載量 (Figure 6B) を示す。封入率は PLA の分子量に対応し、PLA-PEG NP 12k-5k で、PLA-PEG NP 5k-5k と比較し 20~40%程度高い傾向または有意に高い値を示した。PLA の立体異性体の違いによる封入率の顕著な差は認めなかった。(Figure 6A) 同様に、薬物搭載量に関しても、2.3~4.5%を示し、PLA の分子量が高いもので、薬物搭載量が 1~2%程高い傾向または有意に高い値 ($p=0.007$) を示し、立体異性体間での差は認めなかった。(Figure 6B)

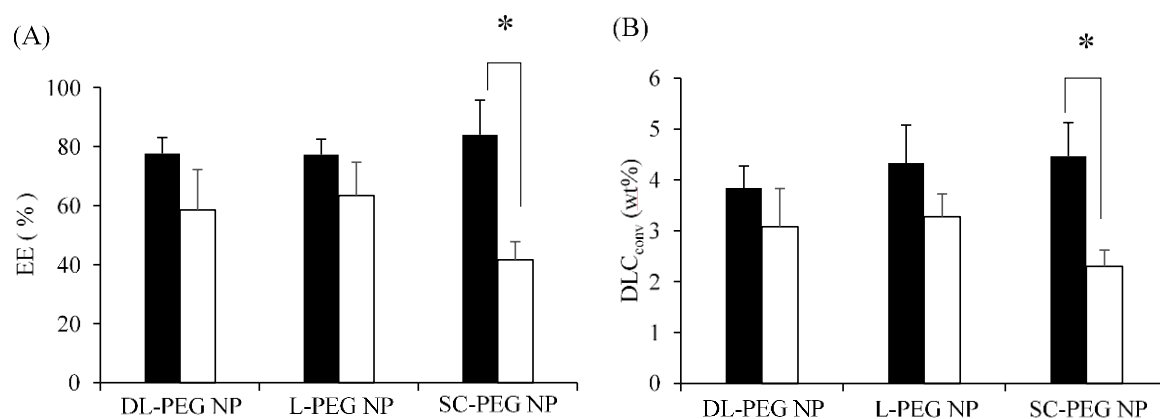


Figure 6 (A) Encapsulation efficiency (EE) and (B) drug loading content (DLC_{conv}) of TAM in PLA-PEG NPs, quantified by the conventional method. Closed bars and open bars indicate PLA-PEG NPs 12k-5k and PLA-PEG NPs 5k-5k, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times. * $p < 0.05$ vs. those with different molecular weights.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure 2)

1.2.2.2 D_h ならびにゼータ電位

Figure 7 には、TAM を搭載しない blank NP と TAM を搭載した PLA-PEG NP の D_h ならびにゼータ電位を示す。

D_h に関して、PLA-PEG の分子量に着目すると、PLA-PEG_{uni} 5k-5k を使用して調製した blank PLA-PEG NP ならびに TAM を搭載した NP の D_h は 30~72 nm であり、PLA-PEG 12k-5k を使用して調製した場合の D_h : 88~162 nm と比較して、小さい結果となった。TAM の搭載により、 D_h は PLA-PEG の分子量や PLA の異性体に依らず、すべての PLA-PEG NP で有意に減少した。(Figure 7A) 一方で、NP の粒子径分布における多分散性指数 (PdI_{NP}) は 0.25 未満であり、調製した PLA-PEG NP は単分散であることが確認された。

Blank PLA-PEG NP のゼータ電位は -21~-12 mV を示した。(Figure 7B) 対照的に、TAM を搭載した PLA-PEG NP のゼータ電位は -5.9~+5.8 mV の範囲であり、すべての PLA-PEG NP で TAM の搭載により、ゼータ電位が有意に上昇した。特に、L-PEG NP 12k-5k と SC-PEG NP 12k-5k はわずかに負のゼータ電位を示したものの、それ以外の PLA-PEG NP は正のゼータ電位を示した。

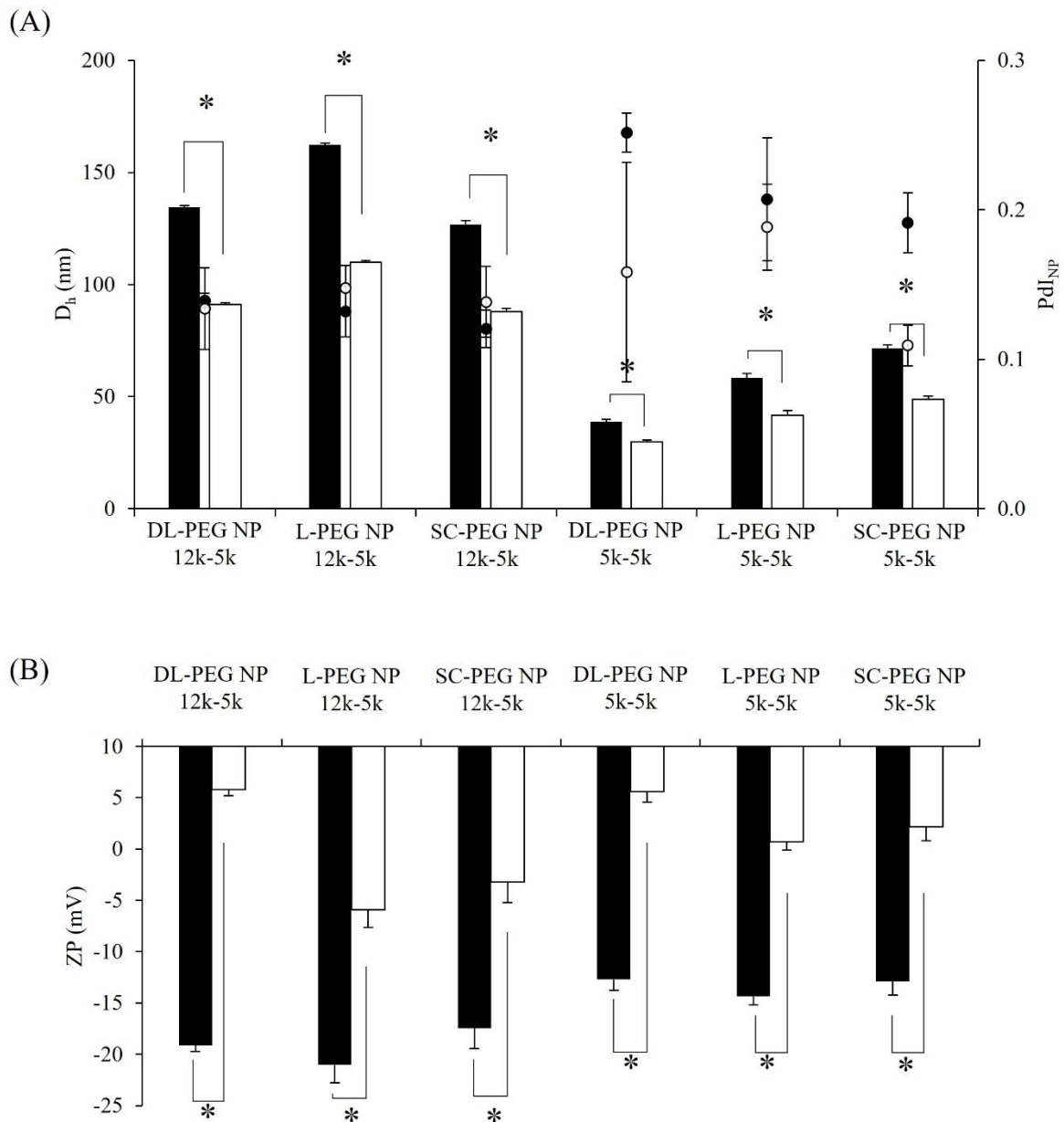


Figure 7 Hydrodynamic diameter (D_h) and zeta potential (ZP) of blank and TAM loaded PLA-PEG NPs. (A) Z-average of D_h and polydispersity index (PdI_{NP}) were plotted on the left and right axis, respectively. Closed and open bars represent the D_h of blank and TAM-loaded NPs, respectively. Closed and open dots represent the PdI_{NP} of blank and TAM-loaded NPs, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation for three samples. Experiments were independently performed three times. * $p < 0.05$ vs. blank NPs. (B) ZP of blank and TAM loaded NPs. Closed and open bars indicate blank and TAM-loaded NPs, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. Experiments were independently performed three times. * $p < 0.05$ vs. blank NPs. (Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure 3)

1.2.2.3 回転半径 (R_g)、流体力学半径 (R_h)、 R_g/R_h 比と会合数

Table 2 に PLA-PEG NP の R_h 、 R_g 、 R_g/R_h 比を示す。 R_g/R_h 比は、粒子形状の指標として算出し、0.76~1.13 の値を示した。 R_g/R_h 比が 1.00 付近の時、粒子は中空状の球体を形成していることを示し、0.77 付近の時、均一な剛性球体であることを示す。(43) つまり、本研究においては、値が小さいほど PLA-PEG NP のコアの密度が高いことを示す。Figure 8 には SEC-MALS の光散乱検出におけるクロマトグラムを示す。すべての NP は単峰性であったため、 R_g/R_h 比は SEC-MALS より算出した R_g と DLS から算出した R_h から算出した。Blank PLA-PEG NP の R_g/R_h 比は、TAM を搭載した PLA-PEG NP と同程度の値を示した。DL-PEG NP 5k-5k ならびに DL-PEG NP 12k-5k は、 R_g/R_h 比が L-PEG NP 5k-5k ならびに L-PEG NP 12k-5k、SC-PEG NP 5k-5k ならびに SC-PEG NP 12k-5k と比較して大きい傾向にあった。L-PEG NP と SC-PEG NP は分子量に依らず、 R_g/R_h 比が 1 未満となり、結晶性の PLA-PEG を用いた場合、非晶質様の DL-PEG を用いた場合と比較して、PLA-PEG NP はコンパクトな構造を取ることが示された。

PLA-PEG NP の会合数を、Figure 9 に示す。TAM の搭載により、すべての NP で会合数は 1/2~1/3 となり、有意に減少した。PLA-PEG の分子量に着目すると、PLA-PEG NP 5k-5k では、PLA-PEG NP 12k-5k と比較して、会合数が約 1/10 に減少した。

Table 2 Hydrodynamic radius (R_h), gyration radius (R_g) and R_g/R_h ratio of different isomer PLA-PEG NPs

NPs	PLA-PEG Mn	R_h^a (nm)		R_g^b (nm)		R_g/R_h ratio	
		Blank	TAM loaded	Blank	TAM loaded	Blank	TAM loaded
DL-PEG NP	12k-5k	66.6±1.7	45.3±0.4	61.0±1.2	44.0±1.2	0.91±0.02	1.00±0.03
L-PEG NP	12k-5k	79.4±1.6	55.4±0.4	70.8±1.0	52.1±1.1	0.89±0.01	0.94±0.03
SC-PEG NP	12k-5k	62.9±2.9	43.1±0.8	52.2±1.9	36.9±1.9	0.86±0.04	0.85±0.04
DL-PEG NP	5k-5k	20.4±0.9	14.6±0.5	22.6±1.0	15.4±0.6	1.13±0.03	1.00±0.06
L-PEG NP	5k-5k	29.4±0.6	20.1±1.0	25.3±2.5	19.8±1.4	0.97±0.10	0.89±0.11
SC-PEG NP	5k-5k	35.6±0.4	23.5±0.8	24.9±2.0	17.5±0.8	0.77±0.06	0.76±0.02

a: R_h were measured by DLS. $R_h=D_h/2$, b: R_g were measured by SEC-MALS. Results were expressed as mean ± SD of three independent experiments.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Table 2)

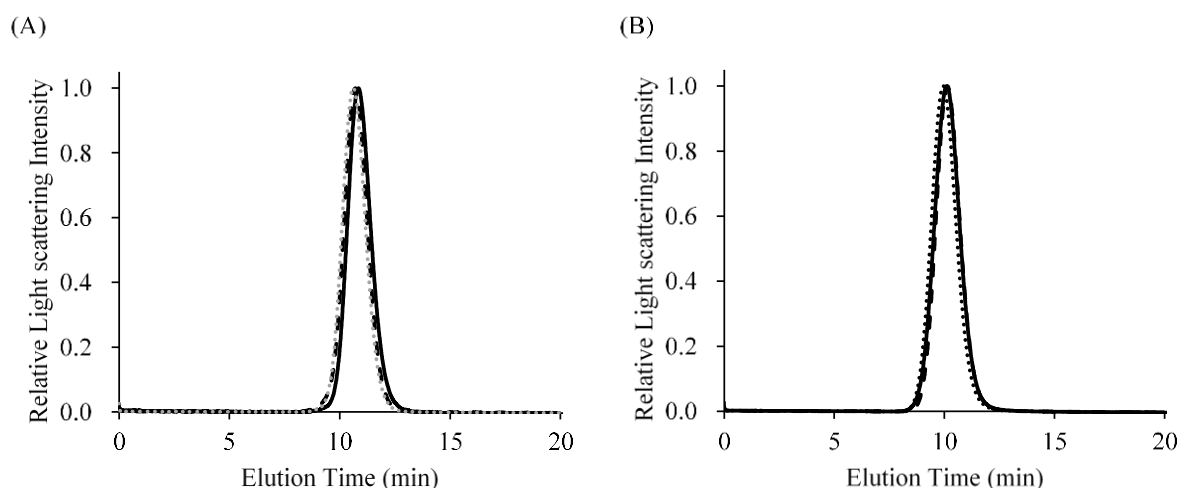


Figure 8 Size exclusion chromatography-multi-angle light scattering (SEC-MALS) chromatograms of (A) PLA-PEG NPs 5k-5k, and (B) PLA-PEG NPs 12k-5k. The solid, dotted, and dashed lines indicate DL-PEG NP, L-PEG NP, and SC-PEG NP, respectively, in both figures.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure S5)

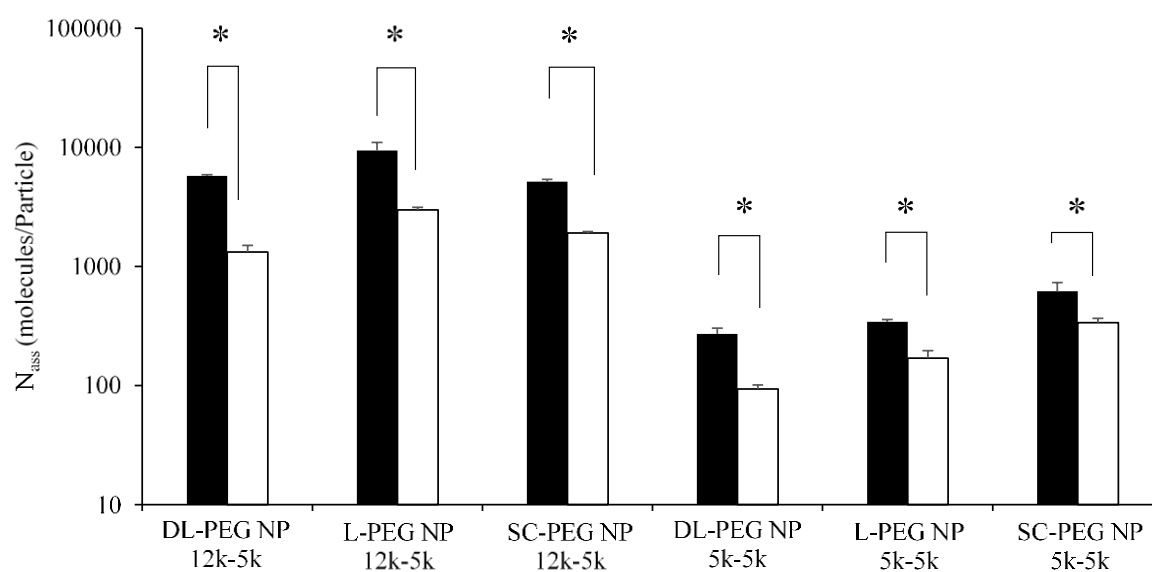


Figure 9 Association number (N_{ass}) of blank and TAM loaded PLA-PEG NPs. Closed and open bars indicate the blank and TAM-loaded NPs, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times. * $p < 0.05$ vs. blank NPs.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure 4)

1.2.2.4 表面 PEG 含量と表面 PEG 密度

Figure 10 に表面 PEG 含量と表面 PEG 密度を示す。ここで、表面 PEG 含量とは、重水素化クロロホルム中で測定した PLA-PEG の PEG 鎖の濃度に対する、重水中で測定した PLA-PEG NP の表面の PEG 鎖の割合を示しており、含有する PEG 鎖の内、表面に露出している PEG 鎖の割合を表す。表面 PEG 密度は、PLA-PEG NP 表面に露出している PEG 鎖の分子数を、PLA-PEG NP の表面積で除して算出した値であり、 100 nm^2 あたりの PEG 鎖の分子数を表す。

Blank PLA-PEG NP 5k-5k の表面 PEG 含量は、それらの立体異性体に依らず、約 60%であった。一方で、blank PLA-PEG NP 12k-5k の表面 PEG 含量は、63~86%の値を示した。PLA の結晶性に着目すると、SC-PEG NP 12k-5k と L-PEG NP 12k-5k の表面 PEG 含量は DL-PEG NP 12k-5k と比較して、高い傾向を示した。PLA-PEG NP 5k-5k の表面 PEG 含量は、TAM の搭載によって有意に増加し、最大 90%程度を示した。SC-PEG NP 12k-5k の表面 PEG 含量は、TAM の搭載によって有意に増加したものの ($p=0.0002$)、DL-PEG NP 12k-5k ならびに L-PEG NP 12k-5k は、TAM 搭載前後で、表面 PEG 含量に変化を認めなかった。(Figure 10A)

Blank PLA-PEG NP 12k-5k の表面 PEG 密度は blank PLA-PEG NP 5k-5k と比較して 2.7~6.7 分子/ 100 nm^2 高値を示した。Blank PLA-PEG NP 12k-5k においては、PLA の結晶性が高い L-PEG NP 12k-5k、SC-PEG NP 12k-5k において、DL-PEG NP 12k-5k と比較し、表面 PEG 密度は 1.5~2.5 分子/ 100 nm^2 高値を示した。しかしながら、TAM の搭載によって、DL-PEG NP 12k-5k と L-PEG NP 12k-5k の表面 PEG 密度は有意に 2.5~3.0 分子/ 100 nm^2 程度低下した。($p=0.004, 0.014$) 対照的に、SC-PEG NP 12k-5k の表面 PEG 密度は、TAM の搭載によっても変化しなかった。結果として、TAM を封入した SC-PEG NP 12k-5k の表面 PEG 密度は、DL-PEG NP 12k-5k、L-PEG NP 12k-5k と比較して、1.5~2.3 倍高い値を示した。(DL-PEG NP 12k-5k : 3.51、L-PEG NP 12k-5k : 5.56、SC-PEG NP 12k-5k : 8.04 分子/ 100 nm^2) PLA-PEG NP 5k-5k に関しては、TAM の搭載によって表面 PEG 密度は変化しなかった。(Figure 10B)

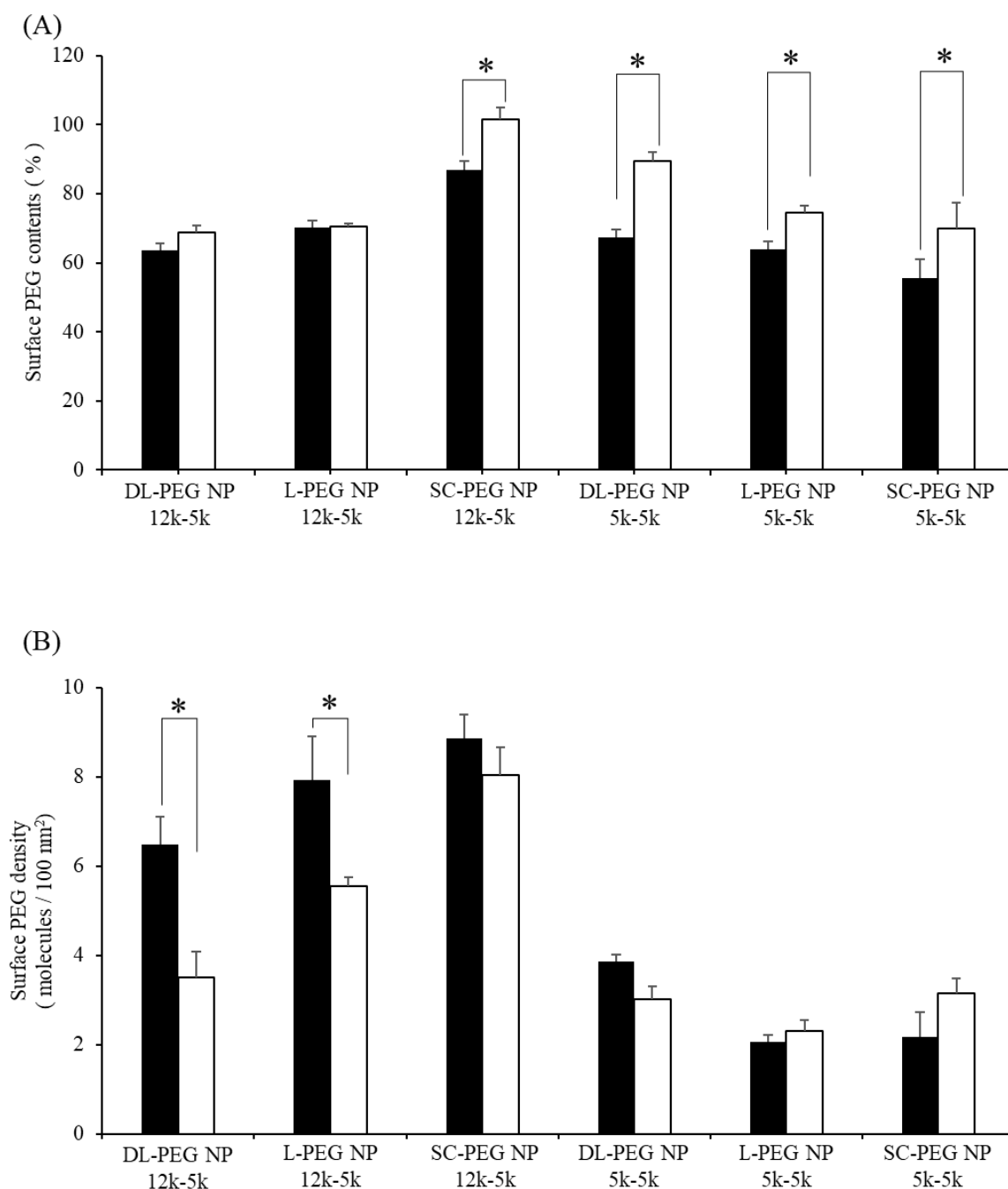


Figure 10 (A) Surface PEG contents and (B) surface PEG density of PLA-PEG NPs composed of different lactide isomers. Closed and open bars indicate blank and TAM-loaded NPs, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times. * $p < 0.05$ vs. NPs.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure 5)

1.2.2.5 PLA-PEG NP 形成中における PLA の結晶性評価

Figure 11 に PLA-PEG NP を作製した後に、凍結乾燥した PLA-PEG NP の XRD スペクトル (A) とバルク状態の PLA-PEG の XRD スペクトル (B) を示す。バルク状態の L-PEG (e) は

$2\theta = 17^\circ$ 付近のピークが確認できるが、PLA-PEG NP を形成した後に凍結乾燥したもの (b) では、そのピークが減弱していることを確認した。一方で、SC-PEG NP を凍結乾燥したもの (c) では、stereocomplex に由来する $2\theta = 12^\circ$ 、 21° 付近のピークが確認された。

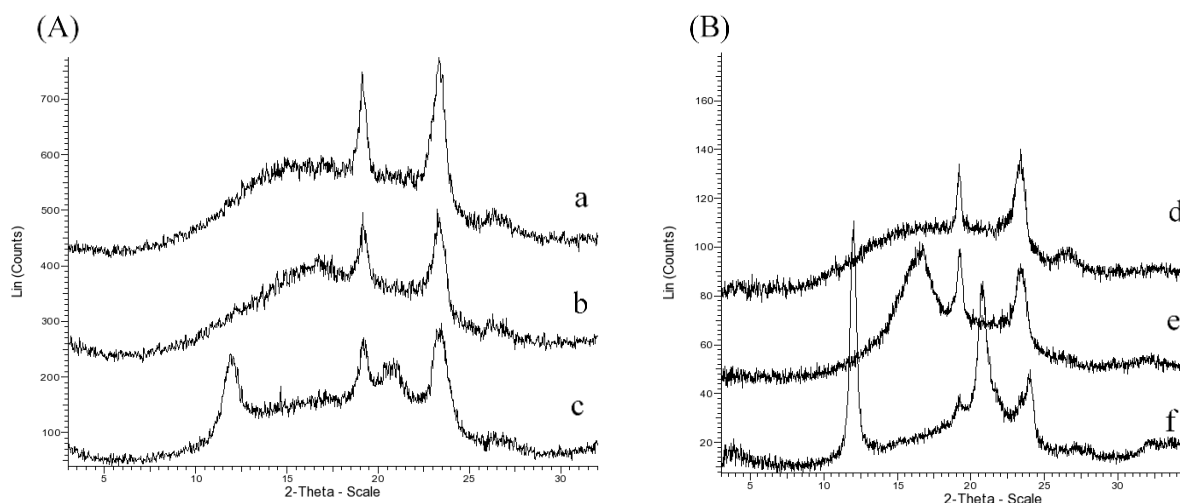


Figure 11 X-ray diffraction (XRD) spectra of (A) lyophilized PLA-PEG NPs and (B) bulk PLA-PEG. The lowercase letter indicates the following samples: a: lyophilized DL-PEG NP 12k-5k, b: lyophilized L-PEG NP 12k-5k, c: lyophilized SC-PEG NP 12k-5k, d: bulk DL-PEG 12k-5k, e: bulk L-PEG 12k-5k, f: bulk SC-PEG 12k-5k.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure S6)

1.2.2.6 PLA-PEG NP の臨界会合濃度 (CAC)

Table 3 に blank PLA-PEG NP の CAC を示す。いずれの PLA-PEG NP も CAC は $1.7 \sim 3.9 \mu\text{g/mL}$ となり、立体異性や PLA の分子量における差を認めなかった。

Table 3 Critical associated concentrations of blank PLA-PEG NPs

NPs	PLA-PEG M_n	CAC ($\mu\text{g/mL}$)
DL-PEG NP	12k-5k	3.05 ± 0.23
L-PEG NP	12k-5k	1.73 ± 0.06
SC-PEG NP	12k-5k	2.73 ± 0.55
DL-PEG NP	5k-5k	2.80 ± 0.78
L-PEG NP	5k-5k	2.52 ± 0.73
SC-PEG NP	5k-5k	3.93 ± 0.80

Results were expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

1.2.2.7 固相抽出による薬物搭載量評価

Figure 12 に固相抽出で算出した薬物搭載量 (DLC_{SPE}) (Figure 12A) と DLC_{SPE} と TAM を搭載した PLA-PEG NP のゼータ電位 (Figure 12B) ならびに 表面 PEG 密度 (Figure 12C) に対してプロットした相関図を示す。

DLC_{SPE} の値は、通常の方法で算出した薬物搭載量と比較し、低値を示した。(Figure 6B, Figure 12A) PLA-PEG NP 5k-5k は、通常の方法で算出した薬物搭載量は 2.3~3.3% となったが、固相抽出で算出した DLC_{SPE} 0.1~0.6% と極めて低い値を示した。L-PEG NP 12k-5k ならびに SC-PEG NP 12k-5k は 2.6% 程度と相対的に高い DLC_{SPE} を示した一方で、DL-PEG NP 12k-5k は PLA-PEG NP 5k-5k と同程度の DLC_{SPE} であった。 DLC_{SPE} について、ゼータ電位と表面 PEG 密度との相関を評価したところ、良好な相関を示した。相関係数 r はゼータ電位に対するプロットで -0.846、表面 PEG 密度に対するプロットで 0.899 を示した。(Figure 12B, Figure 12C) 通常の方法で算出した薬物搭載量を 100% として、表面に吸着している TAM の割合を算出した。(Figure 12D) L-PEG NP 12k-5k ならびに SC-PEG NP 12k-5k については、PLA の分子量が小さいものと比較して、有意に表面への吸着量が低減した。($p=0.006$, 0.0003) また、SC-PEG NP 12k-5k は、DL-PEG NP 12k-5k と比較して 30%、L-PEG NP 12k-5k と比較して 5% 表面への TAM の吸着量が低減した。

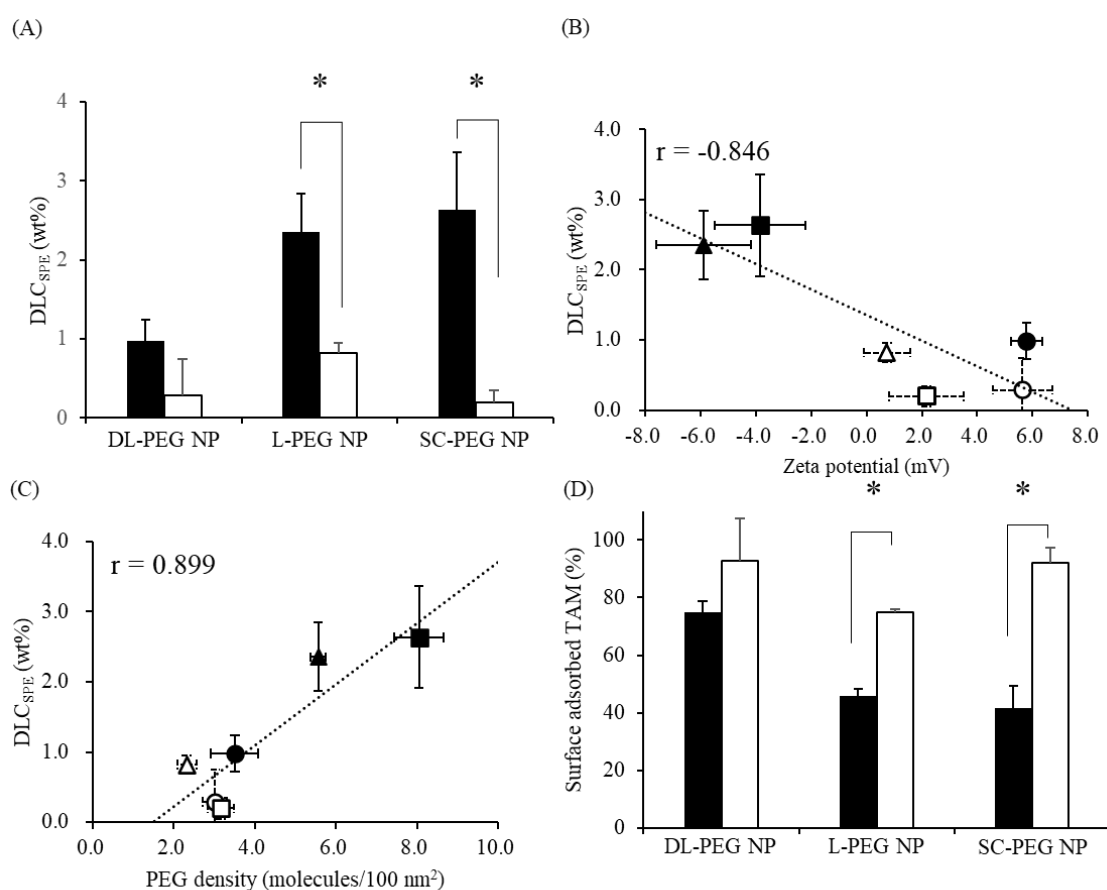


Figure 12 (A) Drug loading content of TAM-loaded PLA-PEG NPs of different isomers and molecular weights, quantified by solid phase extraction (DLC_{SPE}). Closed and open bars indicate PLA-PEG NPs

12k-5k and PLA-PEG NPs 5k-5k, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation for three samples. The experiments were independently performed three times. $*p < 0.05$ vs. those of different molecular weights. (B) Mean DLC_{SPE} plotted as a function of mean zeta potentials and (C) mean surface PEG density. The symbols indicate the following: open circle: DL-PEG NPs 5k-5k, open triangle: L-PEG NPs 5k-5k, open square: SC-PEG NPs 5k-5k, closed circle: DL-PEG NPs 12k-5k, closed triangle: L-PEG NPs 12k-5k, and closed square: SC-PEG NPs 12k-5k in both figures. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times. Correlation curves were calculated using the least square method. (D) Surface adsorbed TAM of TAM-loaded PLA-PEG NPs of different isomers and molecular weights. Closed and open bars indicate PLA-PEG NPs 12k-5k and PLA-PEG NPs 5k-5k, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation for three samples. The experiments were independently performed three times. $*p < 0.05$ vs. those of different molecular weights. (Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure 6)

1.2.2.8 PLA-PEG NP からの TAM の放出特性

Figure 13 には PLA-PEG NP からの TAM の放出プロファイルを示す。Figure 13A は 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 / 0.5% ポリソルベート 80 中の放出プロファイルを示し、Figure 13B は 50 mM 酢酸緩衝液 pH 5.5 / 0.5% ポリソルベート 80 中の放出プロファイルを示す。リン酸緩衝液中での放出プロファイルについては、24 時間時点において、 DLC_{SPE} の結果と相関した。すなわち、PLA-PEG NPs 5k-5k ならびに DL-PEG NP 12k-5k の TAM の放出は、L-PEG NP 12k-5k ならびに SC-PEG NP 12k-5k と比較して速い傾向にあった。対照的に、酢酸緩衝液中での TAM の放出プロファイルに関しては、立体異性体間での差を認めなかったものの、PLA-PEG NPs 12k-5k で、放出速度が遅い傾向を示した。

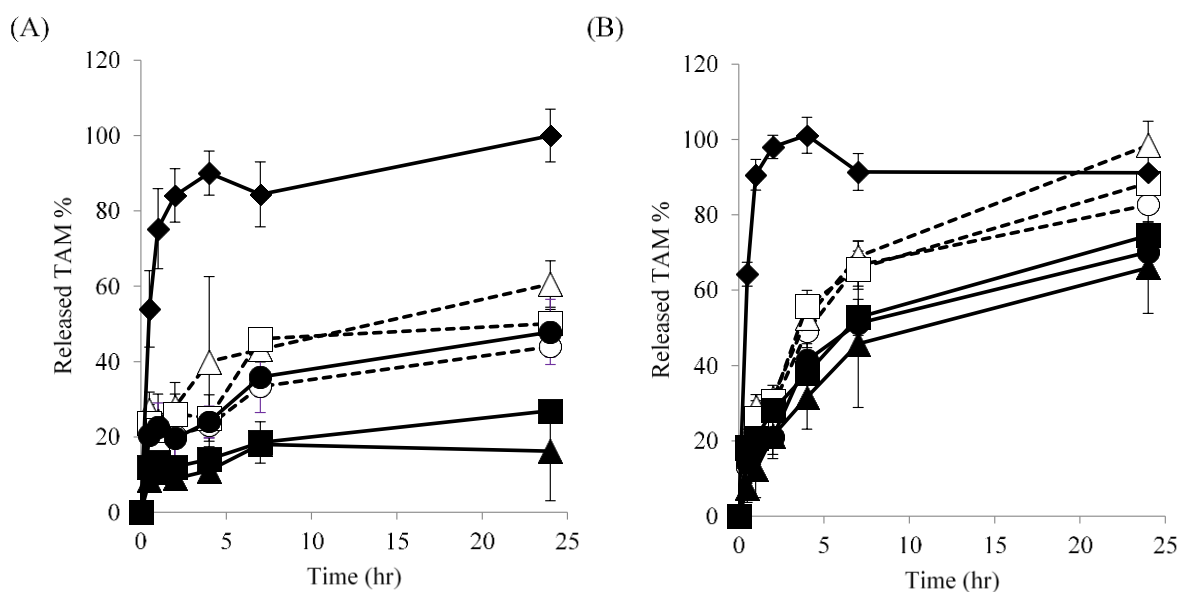


Figure 13 (A) Release profiles of TAM from PLA-PEG NPs in phosphate buffer (pH 7.4) containing

0.5% polysorbate 80 and (B) in acetate buffer (pH 5.5) containing 0.5% polysorbate 80. The symbols indicate the following: open circle: DL-PEG NPs 5k-5k, open triangle: L-PEG NPs 5k-5k, open square: SC-PEG NPs 5k-5k, closed circle: DL-PEG NPs 12k-5k, closed triangle: L-PEG NPs 12k-5k, and closed square: SC-PEG NPs 12k-5k, closed rhombus: free TAM. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure 7)

1.2.3 PLA-PEG NP の血漿中 Pharmacokinetics (PK) プロファイル

本章での PLA-PEG NP の特性解析結果に基づいて、 DLC_{SPE} と表面 PEG 密度が高値を示した、立体異性の異なる PLA-PEG 12k-5k を用いた PLA-PEG NP を選定し、薬物動態試験を実施した。すなわち、DL-PEG NP 12k-5k、L-PEG NP 12k-5k、SC-PEG NP 12k-5k について、マウスにおける PK プロファイルを解析した。

Figure 14 に放射標識された PLA-PEG NP と TAM の血漿中正規化濃度プロファイルを示し、Table 4 に血漿中正規化濃度プロファイルから算出した PK パラメータを示す。DL-PEG NP 12k-5k の ^{111}In -PLA-PEG の血漿中正規化濃度推移は、L-PEG NP 12k-5k ならびに、SC-PEG NP 12k-5k と比較して低値を示した。(Figure 14A) 同様に、DL-PEG NP 12k-5k の血漿中正規化濃度-時間曲線下面積 (AUC) も、L-PEG NP 12k-5k ならびに SC-PEG NP 12k-5k と比較して低値を示した。SC-PEG NP は最も高い AUC を示し、DL-PEG NP 12k-5k と比較して 2.4 倍、L-PEG NP 12k-5k と比較して 1.3 倍であった。(Table 4)

^{14}C -TAM の PK プロファイル解析から、TAM の血漿中正規化濃度は、PLA-PEG NP の立体異性に依らず、対応する ^{111}In -PLA-PEG の半分程度の値を示した。 ^{14}C -TAM の AUC においても SC-PEG NP は最も高い AUC を示し、DL-PEG NP 12k-5k と比較して 4.0 倍、L-PEG NP 12k-5k と比較して 1.5 倍であった。 ^{111}In -PLA-PEG と同様に、DL-PEG NP 12k-5k は、その他の NP と比較して、低い血漿中濃度推移を示した。(Figure 14B) 血漿中半減期 ($T_{1/2}$) に着目すると、立体異性の異なる PLA-PEG NP 間では、PLA-PEG NP と TAM の両方において、SC-PEG NP > L-PEG NP > DL-PEG NP の順となったものの、 ^{111}In -PLA-PEG ならびに ^{14}C -TAM ではいずれの NP も同程度の値を示した。一方で、TAM の分布容積はいずれの PLA-PEG NP においても、 ^{111}In -PLA-PEG と比較して 1.5~3 倍に増大した。遊離型の TAM は、NP と比較して、極めて低い AUC、高い分布容積、短い血漿中半減期を示した。(Table 4)

Figure 15 には、肝臓、脾臓、膀胱における ^{111}In -PLA-PEG の臓器中正規化濃度-時間プロファイルを示す。肝臓と脾臓では L-PEG NP 12k-5k の 40%ならびに 3%と高い集積を認めた。(Figure 15A、Figure 15B) また、膀胱では、DL-PEG NP 12k-5k において、投与初期に高い放射活性を認めた。(Figure 15C)

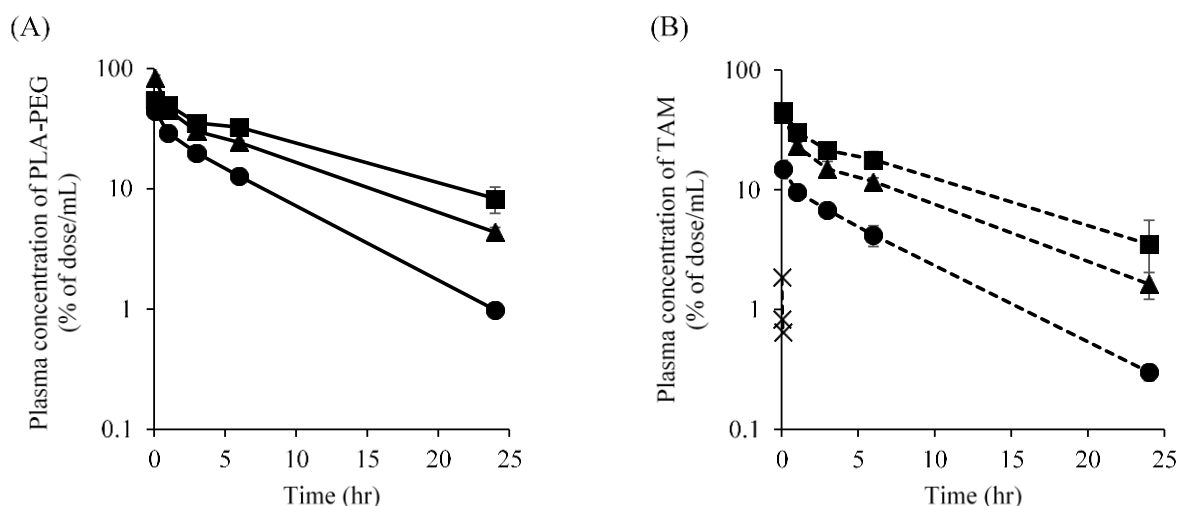


Figure 14 Plasma concentrations of ^{14}C -TAM loaded ^{111}In -PLA-PEG NPs. (A) Plasma concentration profile of ^{111}In -labeled PLA-PEG NPs and (B) loaded ^{14}C -labeled TAM. The closed circles, triangles, and squares represent DL-PEG NP 12k-5k, L-PEG NP 12k-5k, and SC-PEG NP 12k-5k, respectively, in both figures. In the TAM plasma concentration profiles, the cross symbols represent free TAM. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of experiments conducted in three mice. (Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure 8)

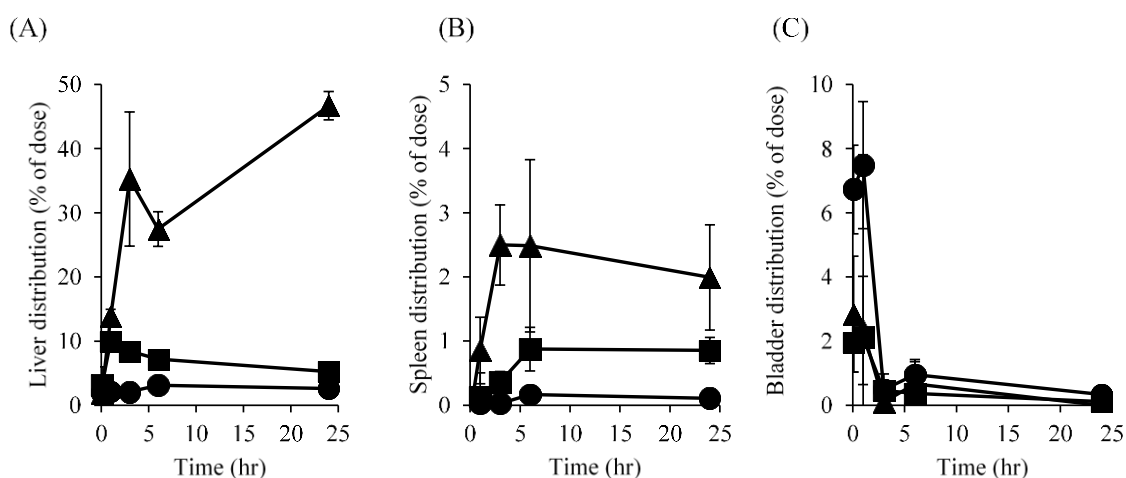


Figure 15 Tissues distribution of ^{111}In labeled PLA-PEG. Tissue concentration profiles of ^{111}In labeled nanoparticles in the (A) liver, (B) spleen, and (C) bladder. The closed circles, triangles, and squares indicate DL-PEG NP 12k-5k, L-PEG NP 12k-5k, and SC-PEG NP 12k-5k, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of experiments conducted in three mice. (Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Figure S7)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of ^{14}C -TAM loaded ^{111}In -PLA-PEG NPs.

	^{111}In -PLA-PEG			^{14}C -TAM		
	AUC ^a	V _d ^b	T _{1/2} ^b	AUC ^a	V _d ^b	T _{1/2} ^b
	%Dose*hr/mL	mL/kg	hr	%Dose*hr/mL	mL/kg	hr
TAM free	-	-	-	0.320	1797	0.04
DL-PEG NP 5k-12k)	295	113	4.58	98.9	335	4.46
L-PEG NP 5k-12k)	557	73.4	6.40	270	142	5.69
SC-PEG NP 5k-12k)	718	78.2	9.07	409	109	7.10

a: Calculated by the trapezoidal method. Mean values of three mice of normalized plasma concentrations were used.

b: Calculated by the 1-compartment model. Mean values of three mice of normalized plasma concentrations were used.

(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Table 3)

1.3 考察

1.3.1 PLA-PEG の原料特性解析

立体異性の異なる lactide を重合し、合成した PLA-PEG は、PLA ドメインの構造に差を認めた。DL-PEG の PLA ドメインは非晶質様の構造を固体状態で示した。一方で、D-PEG 及び L-PEG の PLA ドメインは結晶性を示し、それぞれが反対方向のらせん構造を形成していることが確認された。(Figure 4, Figure 5) さらに、D-PEG と L-PEG の等モル混合物は stereocomplex を形成した。これまでに D-lactide ならびに L-lactide から構成される PLA-PEG が結晶構造を示し、それぞれの等モル混合物が stereocomplex を形成するということが報告されている。(22, 31) さらに、両親媒性分子である indocyanin green-PLA について、D-lactide ならびに L-lactide からなる PLA ドメインがらせん状構造を示すという報告もなされている。(28) 本章の結果は、これまでの報告と整合し、合成した PLA-PEG が異なった 2 次構造、結晶性を有しており、想定している PLA-PEG が合成できていると考えられた。

1.3.2 PLA-PEG NP の構造に及ぼす PLA-PEG の立体異性の影響

PLA-PEG NP の形状比 (R_g/R_h ratio) は PLA の立体異性により、変化した。(Table 2) 過去の報告では、PLA ドメインの分子量は小さいものの、結晶性の PLA-PEG 及び stereocomplex を形成する PLA-PEG NP の形状比は非晶質様の PLA-PEG NP と比較して低値を示している。(31) 本結果もこれまでの報告と一致することから、立体異性の異なる PLA-PEG NP の形状比は、疎水コア部分の PLA ドメインのパッキング状態が、PLA-PEG の立体異性に依存して、変化していると推定された。さらに、凍結乾燥した PLA-PEG NP を使った検討から、バルク状態の PLA ドメインの結晶性と NP を形成した PLA ドメインの結晶性が異なることが示唆されている。(Figure 11) L-lactide から成る PLA-PEG はバルク状態では PLA 部分が結晶

性を示した一方で、NP では PLA の結晶性が低下した。一方 stereocomplex を形成する PLA-PEG 及び SC-PEG NP では、両状態において、PLA ドメインは結晶性を示した。以上の結果からも、SC-PEG NP の PLA コアは結晶を形成することによりコンパクトな構造となっていると考えられる。

1.3.3 PLA-PEG NP の表面 PEG 密度

DL-PEG NP (12k-5k) ならびに L-PEG NP (12k-5k) の表面 PEG 密度は TAM を封入することにより低下した。(Figure 10B) この結果は、TAM を封入することにより、 D_h が小さくなり、PLA-PEG NP の比表面積が増大した結果、表面 PEG 密度が小さくなったと推察された。一方、SC-PEG NP (12k-5k) においては、TAM の封入により、 D_h が小さく、比表面積が大きくなったにも関わらず、PEG の表面密度は変化しなかった。本結果は、SC-PEG NP (12k-5k) においては、TAM の封入による表面 PEG 含量の増大の影響が、比表面積増大よりも大きかったことが影響していると推察される。SC-PEG NP (12k-5k) と DL-PEG NP (12k-5k) 及び L-PEG NP (12k-5k) との表面 PEG 密度に対する挙動の差は、PLA コアの物理化学的な特性に起因していると考えられる。過去の報告において、PLA-PEG NP を貧溶媒析出法で作製した場合に、PLA コアに PEG 鎖が埋もれ、表面 PEG 含量が低下することが報告されている。(44, 45) 1.3.2. で述べたように、SC-PEG NP (12k-5k) は、その PLA コアが結晶性を示すことが確認されている。そのため、NP を形成する過程において、PEG 鎖が PLA のコアに埋もれることが阻害されるため、表面 PEG 密度が高くなったと推定される。

PLA の分子量が小さい PLA-PEG (5k-5k) の表面 PEG 密度は、PLA-PEG (12k-5k) よりも 1/2 ~ 1/4 低値を示した。(Figure 10) 過去のポリ乳酸／グリコール酸 - ポリエチレングリコールブロック共重合体 (PLGA-PEG) NP を用いた報告においては、PEG の重量含量が大きくなるにつれて、表面 PEG 密度が増大することが報告されており、本結果と整合しない。(36) この点については、NP の調製方法に起因していると考えられる。この報告では、乳化-水中乾燥法により PLGA-PEG NP を作製しており、本手法では水系溶媒と混和しないジクロロメタン等の低極性溶媒に PLGA-PEG を溶解させ、エマルションを作製した後に、減圧下で溶媒を除去することで NP を形成する。本方法の場合、溶媒の減圧除去に時間を要するため、その過程で PEG 鎖が水相に配向することが報告されている。(35) 一方で、著者が選択した貧溶媒析出法は、乳化-水中乾燥法に比べて、小さい粒子を再現性良く作製することが可能である。貧溶媒析出法の詳細は第 2 章で述べるが、良溶媒の拡散による疎水化効果で、疎水性コアが析出する速度論的な過程を経る。(45, 46) PEG 鎖は良溶媒中において、相対的な疎水性が高いため、NP 形成時に PEG 鎖が PLA のコアに埋もれることが想定される。本研究においては、PLA-PEG の PLA の分子量が大きいものでは、貧溶媒析出法における疎水化効果が大きくなり、PEG 鎖の包埋が阻害されると想定されるため、これまでの報告と相違があったと推察した。

1.3.4 PLA-PEG NP 中における TAM の局在に及ぼす PLA-PEG NP の物理化学的特性の影響

PLA-PEG NP 12k-5k では、PLA-PEG NP 5k-5k と比較し、80%前後の高い封入率が得られた。(Figure 6A) TAM は疎水性相互作用により、NP に封入されることから、疎水性の PLA ドメインが大きい PLA-PEG NP (12k-5k) で封入率が高かったと推察され、このことは、これまでの報告と一致する。(47) さらに、TAM は分子型での LogP が 7.1 と疎水性が高い。

(48) これまでの報告では、疎水性薬物でその LogP が 3.8 である cabazitaxel を用いた PLA-PEG NP への封入に関して、薬物の PLA と外水相への分配と NP の粒子径が支配因子であることが報告されている。(44) すなわち、分配係数が大きく、粒子径の大きい NP に関して封入率が高くなる。また、paclitaxel (LogP=3.7) の PLA-PEG NP への封入率は 60%前後であり、doxorubicin (logP=1.4) の PLA-PEG NP への封入率は 25%程度であることも報告されている。(31, 49) 以上の報告は本研究で得られた知見と整合するものであり、PLA-PEG NP への疎水性薬物の封入には分配係数と粒子径が寄与していると推察される。

TAM の搭載によって、PLA-PEG NP の D_h は小さくなり (Figure 7A)、SEC-MALS から算出した PLA-PEG の会合数は減少した。(Figure 9) 本結果は、TAM の溶解度が貧溶媒析出法の混合割合である良溶媒を 10%含有する水溶液中において HPLC における検出限界以下であることから、TAM が優先的に水中で析出し、それをコアとして、PLA-PEG の会合が進行したため、PLA コアの成長が阻害され、会合数が小さくなったと推定した。

固相抽出法から算出した DLC_{SPE} と TAM を搭載した PLA-PEG NP のゼータ電位には強い相関を認めた。(Figure 12B) これまでの報告において、固相抽出では、リポソームなどの表面に吸着した薬物を検出できることが報告されている。(50) 従って、本研究においても、TAM が PLA-PEG NP の表面に吸着することで、TAM が塩基性薬物であることから、正電荷を帯びていることが推察された。さらに、 DLC_{SPE} と表面 PEG 密度にも強い相関を認めた。(Figure 12C) 本結果は、疎水性薬物である TAM が PLA の疎水表面に吸着していることを示唆している。表面 PEG 密度が低い場合、PLA の疎水面が露出するため、TAM が疎水吸着すると推察された。SC-PEG NP (12k-5k) と L-PEG NP (12k-5k) はゼータ電位がわずかに負の値を示した。本結果は、両ブロック共重合体の PLA 部分が結晶性であるため、表面 PEG 密度が高くなることで TAM の吸着を抑制し、その結果ゼータ電位がわずかに負の値を示していると推定した。本推察は、固相抽出によって検出される TAM が表面に吸着するとして算出した結果とも整合する。(Figure 12D)

TAM の PLA-PEG NP からの放出挙動に関して、pH7.4 のリン酸緩衝液中での 24 時間における放出量と、 DLC_{SPE} の結果は相関した。第 2 章で詳細を考察するが、本試験系においては、24 時間時点までに、表面に吸着した TAM が放出されることが示唆される。以上から、固相抽出から算出した封入率と放出性が相関したと推察した。一方で、pH 5.5 の酢酸緩衝液中での放出挙動には、PLA-PEG の立体異性体の違いは認めず、PLA の分子量のみに差を認めた。TAM は塩基性薬物であるため、低 pH 環境においては、イオン化し溶解度が向上する。そのために放出性が中性と比較して向上していると推察された。本結果は、TAM の放出が酸性条件下で促進されるといったこれまでの報告 (51) や、疎水化ドメインの分子量が大きい PLA-

PEG NP で疎水性薬物の放出が抑制されるという報告 (47) とも整合する。この pH に応答して、薬物を放出挙動は、がん組織において理にかなっており、がん組織では乳酸代謝が促進されていることが報告されている。(52, 53) 特に L-PEG NP (12k-5k) と SC-PEG NP (12k-5k) はがん標的指向化に対して有用な徐放能を有していると考えられる。封入薬物の物理化学的な特性に着目すると、paclitaxel を封入した PLGA-PEG NP の放出性は、本研究と同様にポリソルベート 80 でシンク条件とし、透析膜を用いた系において、6 時間までで 75% が放出されている。(54) また、doxorubicin の PLA-PEG NP からの放出においては、ポリソルベート 80 などの界面活性剤を添加しない条件において、シンク条件を達成しており、10 時間までで 60～80% の放出を認めている。(31) 以上の結果は、封入と同様に、薬物の疎水性が放出挙動に寄与していることを示唆している。

1.3.5 PLA-PEG NP の PK プロファイルに及ぼす製剤特性の影響

立体異性の異なる PLA-PEG NP の血漿中正規化濃度—時間プロファイルについて、 ^{111}In で標識化した PLA-PEG と ^{14}C で標識した TAM を用いて解析を行った。本章での PLA-PEG NP の投与量は、線形の応答を示す範囲内であることが報告されており、解析した ^{111}In -PLA-PEG の $T_{1/2}$ も報告されているものと同程度の値を示した。(34)

PLA-PEG NP 12k-5k の立体異性に着目すると、非晶質様コアを持ち、表面 PEG 密度が低い DL-PEG NP 12k-5k では、L-PEG NP 12k-5k ならびに SC-PEG NP 12k-5k と比較して、血漿中 AUC と $T_{1/2}$ は低下し、分布容積は増大した。(Table 4) NP は、末梢血管のような血管内径が細い部位を通過する際に、強いせん断を受けることが報告されており、この強いせん断力により、せん断に弱い NP は血中で崩壊することが報告されている。(55) DL-PEG NP (12k-5k) のコアの構造は非晶質様であり、結晶性のコアと比較してせん断の影響を受けやすいと推定される。物理的安定性を示す CAC は、DL-PEG NP 12k-5k の CAC は $3.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 程度であり、評価期間中における血漿中濃度は CAC を十分上回っていることが想定される。さらに、L-PEG NP 12k-5k ならびに SC-PEG NP 12k-5k と比較しても CAC に差を認めなかった。(Table 3) 特に、DL-PEG NP 12k-5k を投与したマウスの膀胱における正規化濃度は、投与初期に増大しており、崩壊した NP が排泄された可能性を示している。(Figure 15C) これらの結果から、DL-PEG NP 12k-5k は血管中で、せん断を受け崩壊した結果、L-PEG NP 12k-5k ならびに SC-PEG NP 12k-5k と比較し短い血中半減期となったと推定された。以上の結果は、立体異性の異なる polymersome を用いたこれまでの検討で、D-lactide または L-lactide を用いた polymersome が DL-lactide を用いた polymersome と比較して高い血漿中 AUC を示した結果とも整合する。(28) L-PEG NP 12k-5k において、SC-PEG NP 12k-5k よりも高い ^{111}In の正規化濃度を肝臓と脾臓において認めた。(Figure 15A and B) 本結果は、表面 PEG 密度が SC-PEG NP 12k-5k において高いために RES への認識が低減し、これら臓器への分布が低下したと推察した。

封入薬物である TAM に着目すると、可溶化した TAM 単体と比較して、 ^{14}C -TAM の血漿中 AUC と $T_{1/2}$ は、検討したすべての PLA-PEG NP において大幅に増大し、PLA-PEG NP を使用するデリバリーシステムが血中滞留性を延長するために有用な手法であることが示され

た。(Table 4) 一方で、 ^{14}C -TAM と ^{111}In -PLA-PEG の血漿中正規化濃度に着目すると、 ^{14}C -TAM では血漿中 AUC は減少し、分布容積は増大している。(Figure 14 and Table 4) しかし、 $T_{1/2}$ に関しては、 ^{14}C -TAM と ^{111}In -PLA-PEG で同程度の値を示した。本結果から、表面に吸着している TAM が速やかに血漿中で放出され、直ちに分布する一方で、封入されている TAM は血漿中で放出されず、NP と同様の体内動態を示すことが推定された。

1.4 小括

第 1 章では、PLA-PEG を構成する lactide の立体異性に着目し、立体異性と PLA の分子量の異なる PLA-PEG の原料特性について、詳細な特性解析を行った。さらに、作製した PLA-PEG NP の製剤特性の解明にあたり、従来の特性解析法に加えて、SEC-MALS、 ^1H -NMR、固相抽出を組み合わせることで、PLA-PEG NP の構造、表面特性について詳細に考察することが可能となった。構築した特性解析手法により、PLA-PEG NP の表面 PEG 密度が PLA-PEG の PLA ドメインの結晶性により変動することを解明した。加えて、表面 PEG 密度と TAM の表面への吸着量にも相関があることを示し、原料特性と製剤特性の関係性を解明した。最後に、立体異性の異なる PLA-PEG NP の体内動態に及ぼす影響を調査し、封入薬物である TAM の PLA-PEG NP 表面への吸着量ならびに PLA-PEG NP の表面 PEG 密度が、PLA-PEG-NP と TAM の体内動態を変動させる製剤特性であることを解明した。本章での研究結果は、原料特性の解析ならびに理解、製剤特性の解析ならびに理解、それらの相関を解明するだけでなく、体内動態との相関やその結果の製剤特性に基づく考察ならびに調査を行った点で、PLA-PEG NP の医薬品開発への応用に有益な基礎的情報を提供するものであると考える。

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

2.1 緒言

第1章では、PLA-PEGの原料特性に注目し、その結晶性、分子量が製剤特性ならびに体内動態に及ぼす影響を調査した。一連の検討で、D-lactide から構成される PDLA-PEG と L-lactide から構成される PLLA-PEG の等モル混合物である stereocomplex を形成する SC-PEG NP が、表面 PEG 密度ならびに、PLA-PEG NP 表面への TAM の吸着を低減し、PLA-PEG NP ならびに TAM の血中滞留性を向上することを明らかとした。

先述の通り、NP 型 DDS 製剤に関するガイドライン、リフレクションペーパーが各国当局から発刊され、規制面での整備も同様に進んでいる。(15-17)これらガイドラインの中では、先に述べた製剤の特性解析結果に基づき、有効性安全性に関わる特性を重要品質特性 (CQA) として同定し、その管理戦略を策定することが要求されている。さらに、NP の製造法と製造パラメータが NP の製剤特性に影響を及ぼすことが報告されており (56, 57)、CQA に影響を及ぼす製造パラメータを重要工程パラメータとして管理する必要がある。(14) また、開発過程において、製造工程への理解を深め、NP の製剤特性への影響について考察し、再現性が高く、特性制御幅の広い工程を設計することが推奨される。(58) しかしながら、製剤特性に及ぼす工程パラメータの影響については、報告がなされているものの、製剤特性評価項目について、体系的に評価しているものはほとんど存在していない。さらに、製剤特性に及ぼす工程パラメータの影響とその PK プロファイルや組織分布に関して調査した報告は限られている。(59)

このような背景に基づき、著者は、SC-PEG NP の製法について、製剤特性に工程パラメータが及ぼす影響を解明し、製剤特性の制御幅の広い方法論を開発することを目的として、検討を行った。製法については、従来のバッチ式の調製法と比較して、再現性の高い製法として報告されている連続的貧溶媒析出法を選択した。(60, 61) その混合機構に関しては、NP 型 DDS 製剤の作製法で汎用されている T-junction を選定した。(62, 63) 連続的貧溶媒析出法において、これまでに温度、総流速 (TFR)、等の工程パラメータが製剤特性に影響を及ぼすことが報告されている。(61, 64) 著者は、これらの工程パラメータに加えて、良溶媒中で PLA-PEG の会合状態を制御することを目的に、臭化リチウム (LiBr) を良溶媒中に添加し、その濃度が製剤特性に及ぼす影響を検証した。LiBr は合成高分子の分析において、低濃度で高分子の分散状態を改善することが古くから報告されている。(65, 66) しかしながら、NP 型 DDS 製剤の調製過程において、LiBr を使用したという報告はなされていない。また、調製時の温度は、原料特性に立脚し、PLA-PEG の PEG ドメインの融解温度を指標として、検討ならびに設定を行った。すなわち、工程パラメータである温度、TFR、良溶媒中の LiBr 濃度を変動させて作製した SC-PEG NP の製剤特性を ¹H-NMR、SEC-MALS、DLS 等の詳細な特性解析法により解析し、製剤特性に及ぼす工程パラメータの影響と製法の再現性ならびに特性制御幅の広さについて検証した。最終的に、異なる工程パラメータで作製した異なる製剤特性を示す SC-PEG NP の体内動態を解析し、製剤特性ならびに体内動態に及ぼす工程パラ

メータの影響を考察した。調製法の理解のために、Figure 16 に第 2 章における NP の調製法の概略を示す。

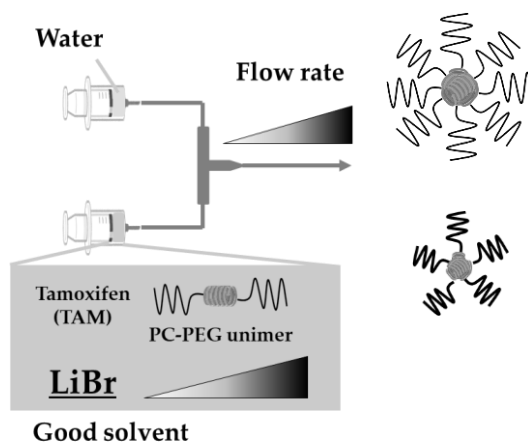


Figure 16 The schematic representation of the nanoparticle preparation.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*., 2022, 14, 568, Figure 1)

2.2 結果

2.2.1 PDLA-PEG と PLLA-PEG の合成と特性解析

Table 5 に合成した PDLA-PEG と PLLA-PEG の M_n と PdI_{uni} を示し、Figure 17B, C に 1H -NMR スペクトルを示す。PLA ドメインの M_n は約 12,000 となり、理論値と一致した。 PdI_{uni} は 2 より小さく、SEC-RI のクロマトグラムも単峰性であった。(Figure 17A)

Table 5 Number-based molecular weight and polydispersity index of synthesized PLA-PEG unimer

Unimers	M_n PEG (g/mole)	M_n PLA (g/mole) *	PdI_{uni} **
PDLA-PEG	5000	12007	1.78
PLLA-PEG	5000	12497	1.82

*: M_n calculated by 1H -NMR, **: PdI calculated by SEC-RI.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*., 2022, 14, 568, Table 1)

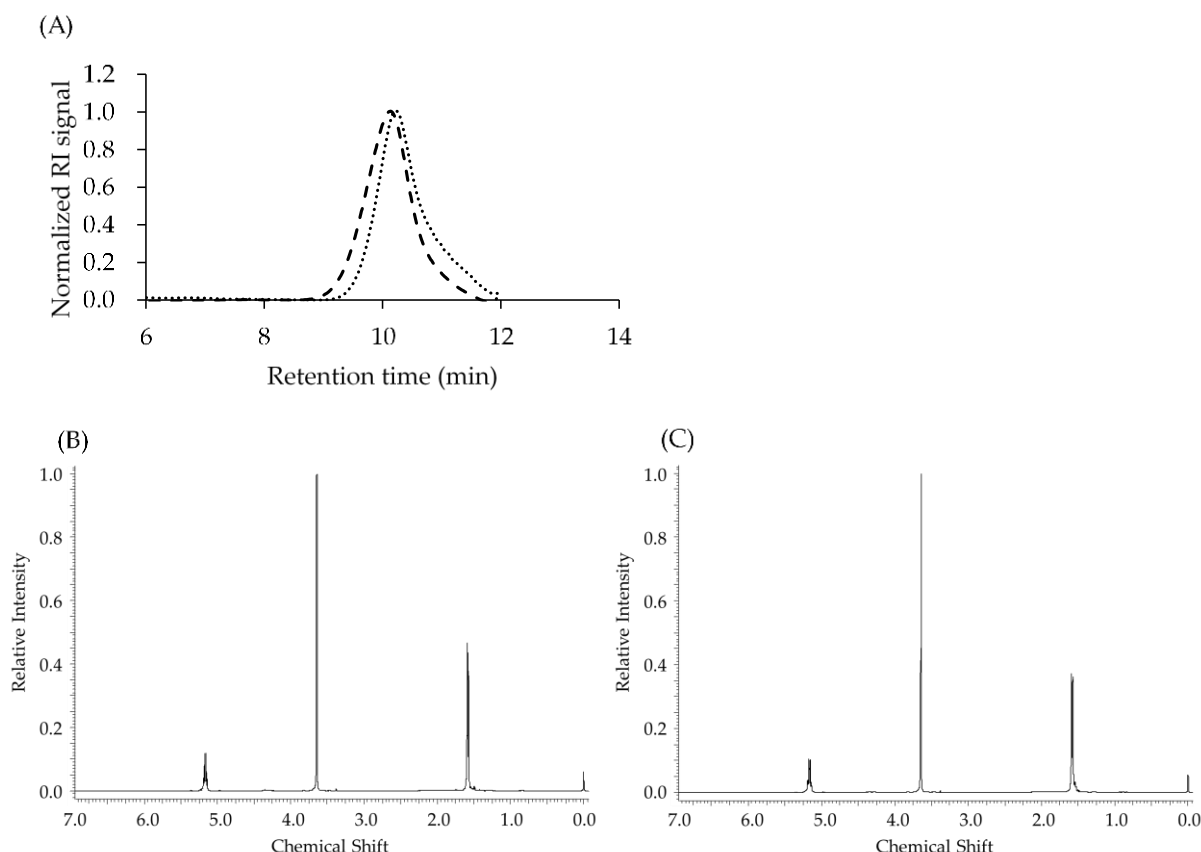


Figure 17 Size-exclusion chromatography–refractive index (SEC–RI) chromatogram and ¹H-NMR spectra of PLA-PEG unimers. Panel A indicates SEC–RI chromatograms. The dotted and dashed lines indicate L-lactide base PLA-PEG unimer and D-lactide-based PLA-PEG unimer, respectively. Panels B and C are ¹H-NMR plots of L-lactide base PLA-PEG unimer and D-lactide-based PLA-PEG unimer, respectively. The following chemical shifts were assigned: 3.31 ppm, CH₃O of methoxy polyethylene glycol; 3.64 ppm, (CH₂-CH₂-O)_n of methoxy-polyethylene glycol; 5.18 ppm, CH of polylactide; and 1.60 ppm, CH₃ of polylactide.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*, 2022, 14, 568, Figure S1)

Figure 18 に PDLA-PEG と PLLA-PEG の示差走査熱分析 (DSC) の熱流束 - 温度プロットを示す。10 °C から 160 °C に昇温する過程において、50 °C 付近に PEG ドメインの融解に起因する吸熱ピーク (下に凸) を PDLA-PEG ならびに PLLA-PEG で認めた。その後、温度を上昇させたところ、PDLA-PEG では 139 °C、PLLA-PEG では 153 °C に PLA の融解に起因する吸熱ピークを認めた。(Figure 18A, Table 6) 160 °C から 10 °C に降温する過程においては、PDLA-PEG では 97 °C、PLLA-PEG では 119 °C に PLA の結晶化に起因する発熱ピーク (上に凸) を認めた。その後、温度を降下させたところ、25 °C 付近に PEG ドメインの結晶化に起因する吸熱性のピークを PDLA-PEG ならびに PLLA-PEG で認めた。(Figure 18B, Table 6)

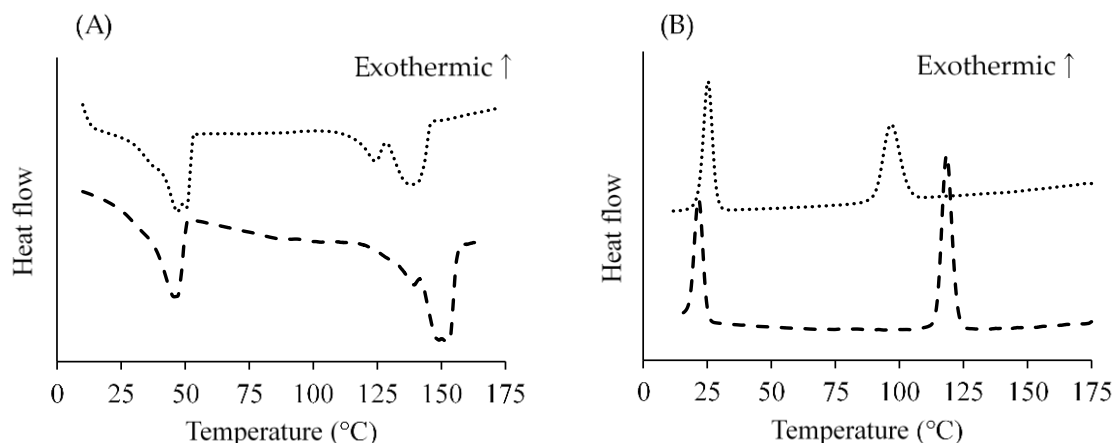


Figure 18 DSC plot of PDLA-PEG and PLLA-PEG. In panels A and B, the total heat flow was plotted as a function of temperature when the temperature was raised from 10 °C to 160 °C (A) and lowered from 160 °C to 10 °C (B). The dotted line and dashed line indicate heat flow of PDLA-PEG and PLLA-PEG, respectively.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*, 2022, 14, 568, Figure 2)

Table 6 Melting temperature (T_m) and crystalline temperature (T_c) of synthesized PLA-PEG characterized by differential scanning calorimetry.

Unimers	PEG T_m (°C)	PEG T_c (°C)	PLA T_m (°C)	PLA T_c (°C)
PDLA-PEG	48.0 ± 2.0	25.2 ± 0.6	139 ± 0.2	96.7 ± 0.1
PLLA-PEG	46.4 ± 0.8	21.7 ± 0.1	153 ± 0.5	119 ± 0.1

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*, 2022, 14, 568, Table 2)

2.2.2 異なる温度で作製した SC-PEG NP の製剤特性

SC-PEG NP の調製温度について、35 °C ($NP_{\text{prep. 35}^\circ\text{C}}$) ならびに 65 °C ($NP_{\text{prep. 65}^\circ\text{C}}$) にて調製し、その物理化学的特性を DLS, SEC-MALS, $^1\text{H-NMR}$ により解析した。 $NP_{\text{prep. 35}^\circ\text{C}}$ ならびに $NP_{\text{prep. 65}^\circ\text{C}}$ の D_h は同程度であったが、 PdI_{NP} は $NP_{\text{prep. 35}^\circ\text{C}}$ において単分散とされる 0.2 より小さい値ではあるが、0.17 と有意に増大した。(Figure 19A) さらに、SEC-MALS を使用した粒子径分布解析では、 $NP_{\text{prep. 35}^\circ\text{C}}$ において、 R_g が大きく粗大な粒子画分が存在しており、多分散であることを確認した。(Figure 19B) 表面 PEG 密度を解析したところ、 $NP_{\text{prep. 35}^\circ\text{C}}$ では、 $NP_{\text{prep. 65}^\circ\text{C}}$ と比較して 6.7 分子/100 nm² から 4.3 分子/100 nm² と有意に低下した。(Figure 19C) 本結果より、以降の検討における、SC-PEG NP の調製温度を 65 °C とした。

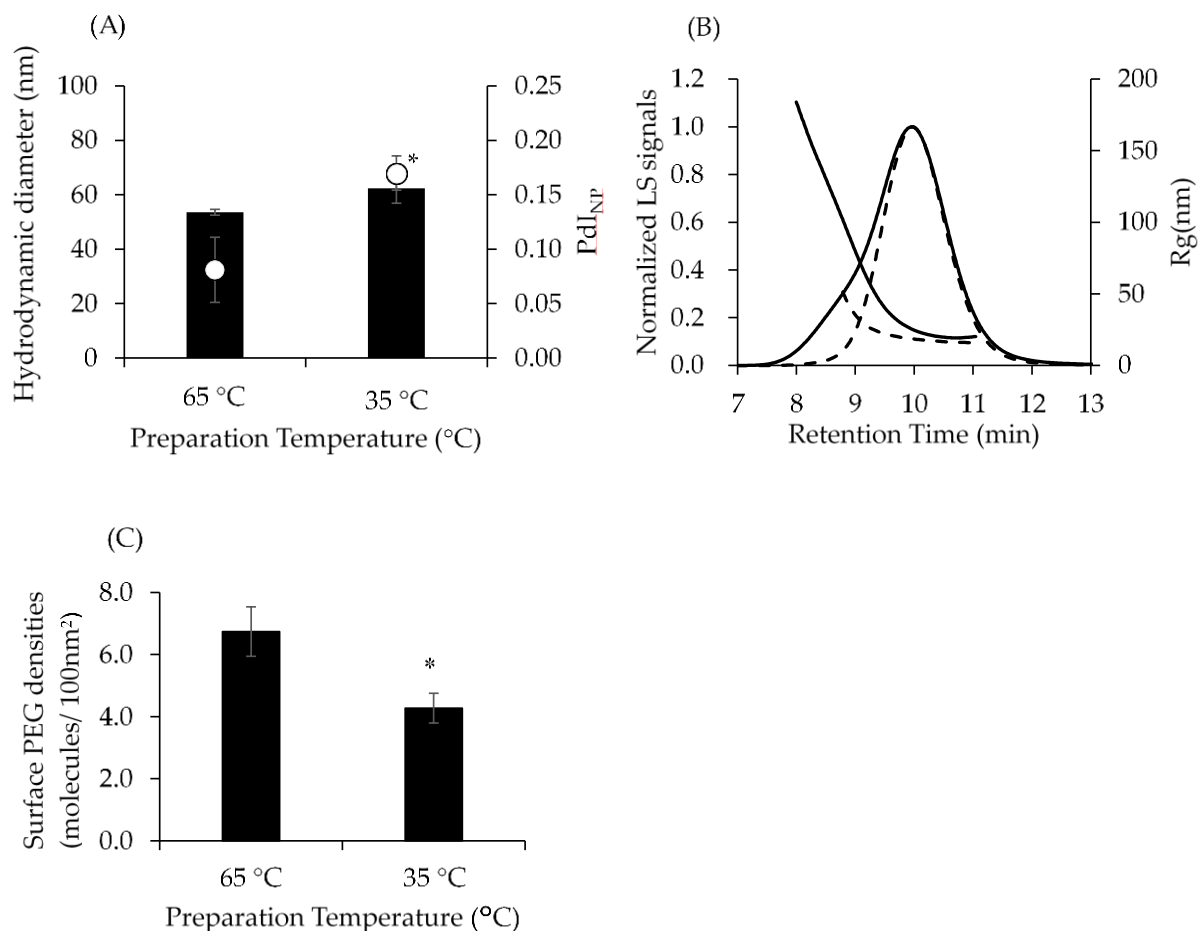


Figure 19 Characteristics of SC-PEG NPs prepared in different temperatures. Panel (A) shows the hydrodynamic diameters (D_h) and polydispersity index (PdI_{NP}). Solid bars and open circles indicate D_h (left axis) and PdI_{NP} (right axis), respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times; * $p < 0.05$ compared with preparation temperature 65 °C. Panel (B) represents the SEC-MALS chromatogram. Solid lines and dashed lines indicate NPs prepared at 35 °C and 65 °C, respectively. Left and right axis represents light scattering signals and gyration radius (R_g), respectively. Panel (C) shows surface PEG densities. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times; * $p < 0.05$ compared with preparation temperature 65 °C.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*., 2022, 14, 568, Figure 3)

2.2.3 異なる LiBr 濃度を含有する良溶媒中での SC-PEG のコンフォメーション

異なる濃度の LiBr を含有する DMF を移動相とする SEC-RI を用いて PDLA-PEG と PLLA-PEG の混合物である SC-PEG の良溶媒中でのコンフォメーションを評価、推定した。(Figure 20) LiBr を含有しない移動相においては、溶出時間 6.6 min 付近に SC-PEG の凝集物と推定されるピークを認めた。一方で、20 mM LiBr を含有する移動相では、SC-PEG のクロマトグラムは単峰性を示した。(溶出時間 10.1 min) LiBr の濃度を 20 mM から 100 mM、300 mM と増大させたところ、SC-PEG のピークトップは溶出時間が早い方向にシフトしたが、すべて単峰

性であった。Table 7 に LiBr 濃度の異なる移動相条件での、ピークトップにおけるポリエチレンオキサイドに対する相対分子量 (Rel. M_p) と PdI_{uni} を示す。100 mM LiBr ならびに 300 mM LiBr を含有する移動相中での Rel. M_p は 14,189 g/mole と 22,610 g/mole であり、20 mM LiBr を含有する移動相中での 8,916 g/mole と比較して比べて、1.5~2.5 倍に増大した。300 mM LiBr の PdI_{uni} は 3.52 を示し、多分散であることが示唆された。

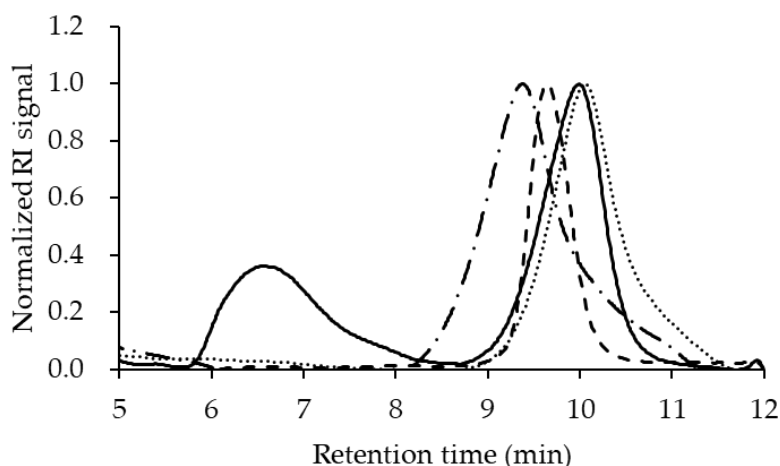


Figure 20 Size-exclusion chromatograms of SC-PEG in solvents containing different concentrations of LiBr. Normalized refractive index signals were plotted as a function of retention time. The solid line, dotted line, dashed line, and chain line indicate DMF containing 0 mM, 20 mM, 100 mM, and 300 mM LiBr, respectively.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics.*, 2022, 14, 568, Figure 4)

Table 7 Relative molecular weight and polydispersity of SC-PEG unimer in DMF containing LiBr

LiBr concentration	0 mM	20 mM	100 mM	300 mM
Rel. M_p (g/mole) *	9,636	8,916	14,189	22,610
PdI_{uni}	**	1.86	1.11	3.52

* Relative molecular weight of peak top. ** PdI_{uni} cannot be calculated

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics.*, 2022, 14, 568, Table S1)

2.2.4 異なる LiBr 濃度／TFR により調製した TAM 搭載 SC-PEG NP の特性解析

2.2.4.1 薬物搭載量と放出特性

Figure 21 に TAM の薬物搭載量 (Figure 21A) と DLC_{SPE} (Figure 21B) を示す。また、Figure 22A に封入率を示す。300 mM LiBr を含有する良溶媒を用いた場合には、他の調製条件と比較して有意に低い薬物搭載量、 DLC_{SPE} ならびに封入率を示した。 DLC_{SPE} の値は薬物搭載量の半分程度の値となり、TAM が表面に吸着していることが示唆された。薬物搭載量と DLC_{SPE}

に及ぼす TFR の影響は軽微であったが、検討した範囲内では、流速の低下とともに、薬物搭載量と DLC_{SPE} が増加する傾向にあった。Figure 22B に調製した SC-PEG NP からの TAM の放出挙動を示す。300 mM LiBr を含有する良溶媒を用いて調製した SC-PEG NP は、封入率が低値を示し、TAM 濃度に対する PLA-PEG 濃度の比率が他の調製条件と著しく異なることから、放出性評価を実施しなかった。調製したすべての SC-NP は、24 時間まで直線的に放出され、その後、48 時間まで放出が抑制された。その後、再度 96 時間まで直線的に TAM が放出された。

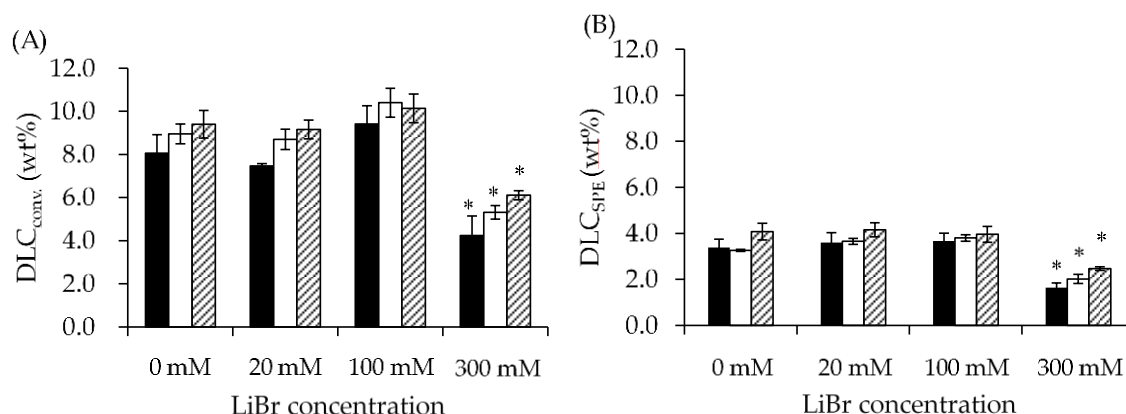


Figure 21 Drug loading contents (DLC) quantified by conventional method ($DLC_{conv.}$, A) and solid-phase extraction (DLC_{SPE} , SPE) method (B). Filled bars, open bars, and hatched bars indicate flow rates of 8 mL/min, 3 mL/min, and 1 mL/min, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times; * $p < 0.05$ to all other LiBr concentrations.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics.*, 2022, 14, 568, Figure 5)

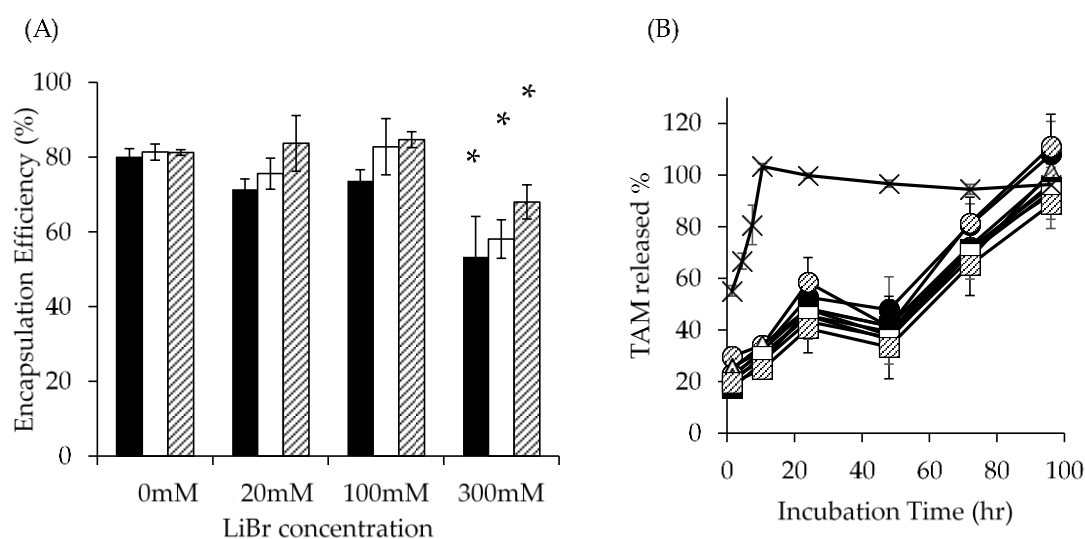


Figure 22 Encapsulation efficiency (EE) and release profile of tamoxifen (TAM) from SC-PEG

nanoparticles (NPs). Panel A shows EE quantified by conventional method. Filled, open, and hatched bars indicate flow rates of 8 mL/min, 3 mL/min, and 1 mL/min, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times; $*p < 0.05$. Panel B shows release profile of TAM from NPs prepared by different process conditions. Closed, open, and hatched symbols indicate flow rates of 8 mL/min, 3 mL/min, and 1 mL/min, respectively. Circle, triangle, and square symbols indicate LiBr concentrations of 0 mM, 20 mM, and 100 mM, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times.
(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*., 2022, 14, 568, Figure S2)

2.2.4.2 異なる工程パラメータで作製した SC-PEG NP の D_h , PdI_{NP} ならびに表面 PEG 密度

Figure 23A、B に D_h ならびに PdI_{NP} を示す。LiBr 濃度と TFR を変動させた場合の、 D_h は 54~122 nm を示した。 PdI_{NP} は 0.2 以下となり作製した SC-PEG NP はすべて単分散であった。

LiBr 濃度と TFR の交互作用に関して、 D_h と PdI_{NP} それぞれについて、応答曲面法を用いて評価した。交互作用とは、工程パラメータのそれぞれの変動が、ある製剤特性に対して、影響を及ぼしあっている状態を指す。Figure 24A、B に D_h と PdI_{NP} の応答曲面を示す。応答曲面は、2 次モデルにより解析した。 D_h に対する F 値は 115, $p = 3.0 \times 10^{-17}$ を示し、 PdI_{NP} に対する F 値は 12.0, $p = 1.9 \times 10^{-5}$ を示したことから、解析した両モデルが統計学的に有意であることが示された。また、相関係数 (R^2) は D_h では 0.91、 PdI_{NP} では 0.53 となった。以上から、LiBr 濃度と TFR には相反する交互作用が存在し、 D_h と PdI_{NP} は LiBr 濃度を増加させるまたは、TFR を減少させることで増大することが示された。

Figure 24C には、 D_h と表面 PEG 密度の相関関係を示す。 R^2 値は 0.64 となり、2 つの製剤特性値は、強い相関を示した。表面 PEG 密度については、 D_h と同様の傾向を示し、6.7~16.6 分子/100 nm² となった。(Figure 23C) これらの結果は、TFR の増大や LiBr 濃度の減少が、 D_h を小さくすることで、表面 PEG 密度を減少させていることを示している。

Figure 24D に調製した SC-PEG NP の凍結乾燥後の形態について、フィールドエミッション走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) により観察した典型例を示す。調製した NP は、球状であることが確認できた。Figure 24D 下図は調製条件として、100 mM LiBr/ TFR 3 mL/min として調製した SC-PEG NP の形態を示し、Figure 24D 上図は 20 mM LiBr/ TFR 8 mL/min として調製した SC-PEG NP の形態を示す。100 mM LiBr/ TFR 3 mL/min として調製した SC-PEG NP では、1 次粒子が大きいことを確認した。

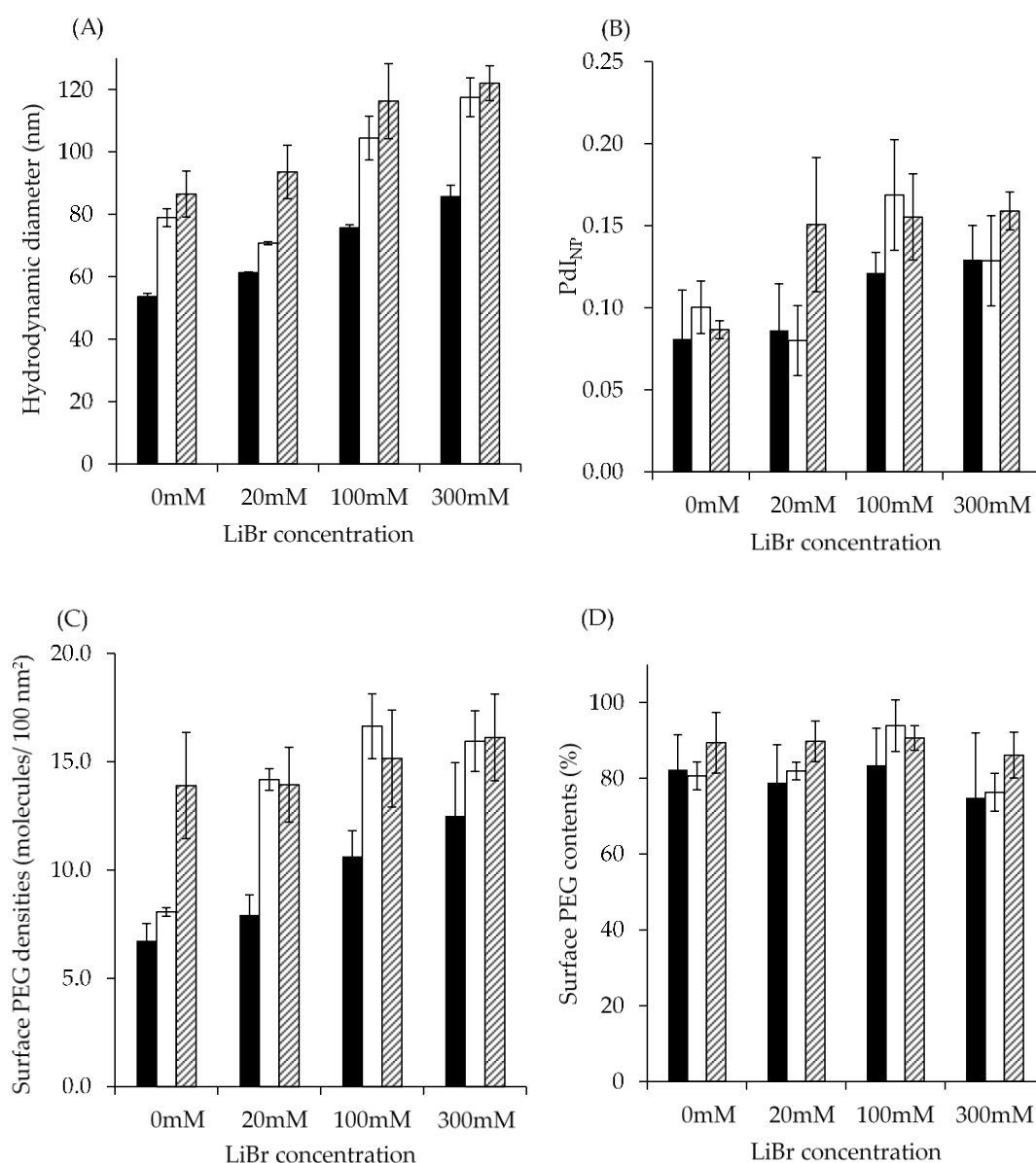


Figure 23 Hydrodynamic diameters (D_h), polydispersity index (PdI_{NP}), surface PEG densities, and surface PEG contents of SC-PEG nanoparticles (NPs) prepared by different process conditions. Panels A, B, C, and D show D_h , PdI_{NP} , surface PEG densities, and surface PEG contents of SC-PEG NPs, respectively. Filled, open, and hatched bars indicate flow rates of 8 mL/min, 3 mL/min, and 1 mL/min, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*, 2022, 14, 568, Figure S3)

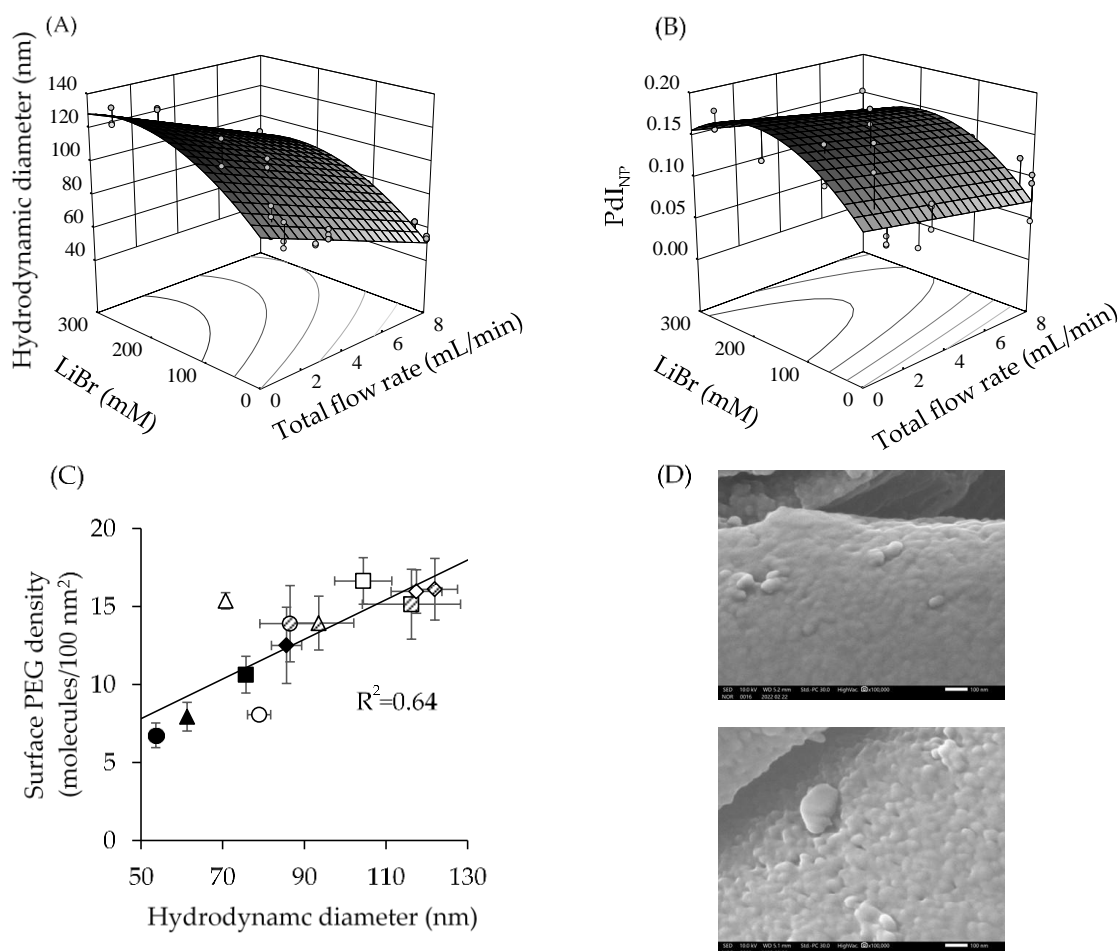


Figure 24 Response surface of hydrodynamic diameters (D_h) and polydispersity (PDI_{NP}) of nanoparticles (NPs), relationship between D_h and surface PEG densities, and FE-SEM image of lyophilized NPs. Panels (A) and (B) show the response surface of D_h and PDI_{NP} , respectively. Circle symbols indicate individual values. Response surfaces were fitted by quadratic models. Panel (C) indicates surface PEG densities plotted as a function of D_h . Closed, open, and hatched symbols indicate TFRs of 8 mL/min, 3 mL/min, and 1 mL/min, respectively. Circles, triangles, squares, and diamonds indicate LiBr concentrations = 0 mM, 20 mM, 100 mM, and 300 mM, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. Correlation curves were fitted by a linear model using the least squares method. Panel (D) shows the FE-SEM image magnified 100,000 times. The upper panels show morphologies of lyophilized NPs prepared with 20 mM LiBr/TFR 8 mL/min. The lower panel shows the morphology of lyophilized NPs prepared with 100 mM LiBr/TFR 3 mL/min. Bars represent 100 nm scales.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*., 2022, 14, 568, Figure 6)

2.2.4.3 凍結乾燥した SC-PEG NP の PLA ドメインの T_m

Figure 25 に異なる工程パラメータで作製した SC-PEG NP を凍結乾燥した後に DSC より評価した際の PLA ドメインの T_m を示す。TFR が異なる場合には、PLA ドメインの T_m は変化し

なかった。LiBr 濃度に注目すると、300 mM LiBr を添加した場合にのみ、PLA ドメインの T_m が 2~3 °C 有意に上昇した。

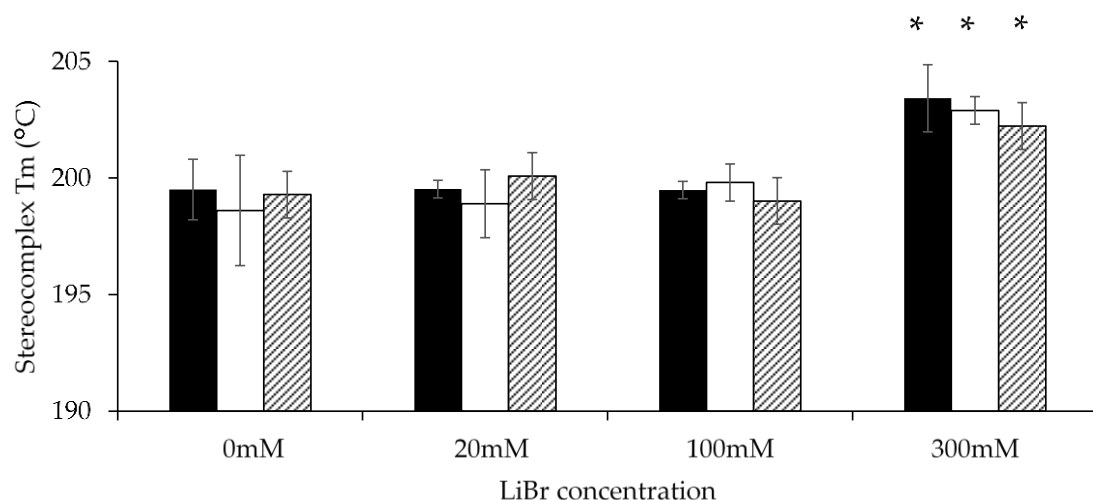


Figure 25 Melting temperature (T_m) of PLA domain in lyophilized SC-PEG nanoparticles (NPs) prepared by different processing parameters. Melting temperature of PLA domain of lyophilized SC-PEG NPs is presented. Filled, open, and hatched bars indicate flow rates of 8 mL/min, 3 mL/min, and 1 mL/min, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times; * $p < 0.05$ compared with other LiBr concentrations at same total flow rate.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics.*, 2022, 14, 568, Figure S4)

2.2.5 異なる工程パラメータにより作製した異なる表面 PEG 密度と D_h を有する SC-PEG NP の血漿中 PK プロファイルと組織中分布

検証結果から、SC-PEG NP の製剤特性として、 D_h と表面 PEG 密度はトレードオフの関係にあることを明らかとした。そのため、 D_h と表面 PEG 密度が異なる 2 種類の SC-PEG NP を調製し、血漿中正規化濃度プロファイルと組織分布を評価した。一方は、 D_h : 61 nm、表面 PEG 密度 : 7.90 molecules/ 100 nm² とした SC-PEG NP (NP_{Sparese-Small}) であり、工程パラメータは 20 mM LiBr/ TFR 8 mL/min として調製した。もう一方は、 D_h : 105 nm、表面 PEG 密度 : 16.6 molecules/ 100 nm² とした SC-PEG NP (NP_{Densee-Large}) であり、工程パラメータは 100 mM LiBr/ TFR 3 mL/min として調製した。

Figure 26 に、製剤特性の異なる 2 種類の SC-PEG NP をマウスに投与した際の PK プロファイルを示す。また、Table 8 に ¹¹¹In-SC-PEG NP と ¹⁴C-TAM の血漿中正規化濃度プロファイルから算出した PK パラメータを示す。NP_{Densee-Large} の ¹¹¹In-SC-PEG NP ならびに ¹⁴C-TAM の血漿中正規化濃度と AUC、初期濃度 (C_0) ならびに消失相の半減期 ($T_{1/2\beta}$) は NP_{Sparese-Small} と比較して AUC で 1.2 倍、 C_0 で 1.1 倍、 $T_{1/2\beta}$ で 1.1~1.2 倍程度高値を示した。(Figure 26A, D, Table 8) また、分布容積、全身クリアランス (CL_{tot}) についても、NP_{Densee-Large} では、NP_{Sparese-}

$_{Small}$ と比較して10~25%程度低値を示した。分布相の半減期 ($T_{1/2\alpha}$) については、 ^{111}In -SC-PEG NP と ^{14}C -TAM とともに、両 SC-PEG NP 投与群間で差を認めなかった。

^{111}In -SC-PEG NP ならびに ^{14}C -TAM の肝臓、脾臓中における正規化濃度—時間プロファイルを Figure 26B, C, E, F に示す。肝臓においては、 ^{111}In -SC-PEG NP ならびに ^{14}C -TAM の両方において、NP_{Sparse-Small} と比較し、NP_{Dense-Large} の移行量が10%程度有意に低い結果となった。脾臓についても肝臓と同様の傾向を示したものの、両群間で有意な差を認めなかった。

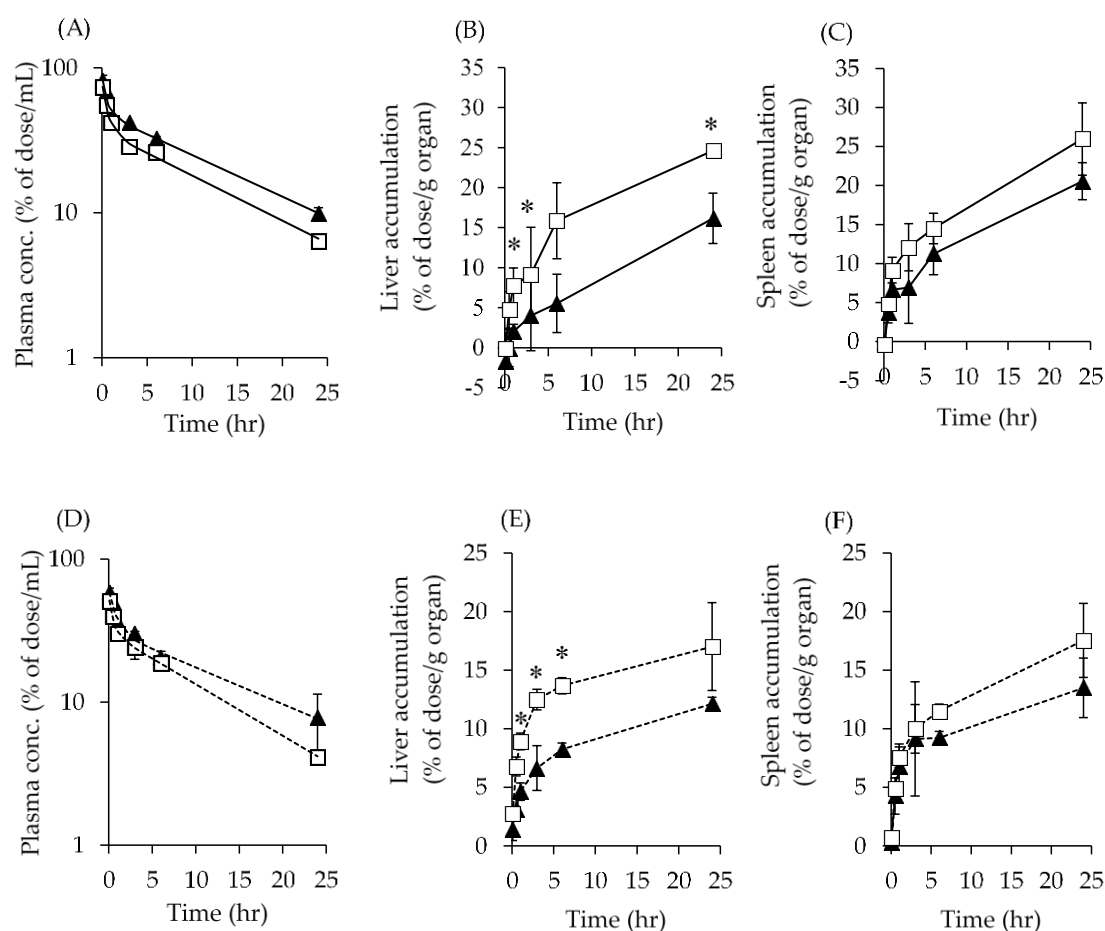


Figure 26 Pharmacokinetics and tissue distributions of ^{14}C -TAM-loaded ^{111}In -SC-PEG nanoparticles (NPs). Panels (A), (B), and (C) show normalized plasma concentration, liver distributions, and spleen distributions of ^{111}In -SC-PEG NPs, respectively. Panels (D), (E), and (F) show normalized plasma concentration, liver distributions, and spleen distributions of ^{14}C -TAM, respectively. Filled triangles and open squares indicate SC-PEG NPs prepared by LiBr 100 mM at a flow rate of 3 mL/min, and LiBr 20 mM at a flow rate of 8 mL/min, respectively. Solid lines and dashed lines in panels A and D, respectively, indicate two-compartment model fitted curves. Results are expressed as mean \pm standard deviation of three mice: * $p < 0.05$ compared to SC-PEG NPs prepared by LiBr 100 mM at a flow rate of 3 mL/min. (Ogawa et. al., *Pharmaceutics.*, 2022, 14, 568, Figure 7)

Table 8 Pharmacokinetics parameters of PEG_{Small-Sparse} NPs and PEG_{Large-Dense} NPs.

	Plasma AUC * (hr *% of dose/mL)	T _{1/2α} ** (min)	T _{1/2β} ** (min)	CL _{tot} ** (mL/min)	V _d ** (mL)	C ₀ ** (% of dose/ mL)
¹¹¹ In-SC-PEG						
NP _{Large-Dense}	640	0.374	10.5	0.133	1.95	88.9
NP _{Small-Sparse}	497	0.416	9.67	0.184	2.45	80.1
¹⁴ C-TAM						
NP _{Large-Dense}	441	0.570	11.7	0.179	2.89	61.8
NP _{Small-Sparse}	362	0.343	8.35	0.262	3.06	55.6

* Calculated using the trapezoidal method. The mean values of the three mice with normalized plasma concentrations were used. **: Calculated by the two-compartment model. The mean values of the three mice with normalized plasma concentrations were used.

(Ogawa et. al., *Pharmaceutics*, 2022, 14, 568, Table 3)

2.3 考察

2.3.1 SC-PEG NP の製剤特性に及ぼす調製温度の影響

SC-PEG NP の調製温度は、PdI_{NP} と表面 PEG 密度に影響した。(Figure 19) 本結果は、DSC を使用した熱分析結果が示すように、PLA-PEG の PEG ドメインのコンフォメーション、運動性が温度によって変化したためと考えられる。(Figure 18) PDLA-PEG ならびに PLLA-PEG の PEG ドメインの T_m はそれぞれ 48.0 °C ならびに 46.4 °C であった。(Figure 18A, Table 6) PEG ドメインの T_m よりも低い調製温度において、PEG ドメインの分子運動性が部分的に低下するため、良溶媒と十分に相互作用することが出来ず、PLA-PEG が良溶媒中で部分的に凝集したためと推察された。35 °C で調製する過程において、PDLA-PEG と PLLA-PEG を良溶媒に溶解させた溶状は澄明であり、凝集体などは目視で確認出来なかったため、ミクロなスケールで PEG ドメインの一部が、PLA のコア部分に埋もれて溶解、分散していることが推察される。以上の理由から、NP_{prep. 35 °C} の粒子径分布が多分散となり、NP_{prep. 65 °C} と比較して表面 PEG 密度が低下したと考察した。これまでの報告では、di-block 型のブロック共重合体において、バルク状態の PEG 鎖のコンフォメーションはその結晶化温度によって変化することが報告されている。(67, 68) さらに、PLA-PEG NP や PLGA-PEG NP を貧溶媒析出法で作製した場合には、PEG 鎖がそのコアに埋もれることも報告されていることから (44, 45)、本考察とも整合するものであると考えられる。

2.3.2 LiBr 濃度と TFR の制御による SC-PEG NP の製剤特性変動

SC-PEG のコンフォメーションは良溶媒中の LiBr の濃度によって変化した。(Figure 20) これまでの報告でも、LiBr は高分子の溶液中でのコンフォメーションを変化させることが報告されている。(65, 66) 本章における検討結果も、これらの報告と一致している。LiBr を 20 mM 添加する条件においては、LiBr は SC-PEG の疎水性ドメイン同士の相互作用を抑制した

結果、分散状態を改善したと推察される。これまでの報告において、LiBr の添加が高分子の双極子モーメントを遮蔽することにより、分散状態を改善することが報告されており、今回の結果はこれまでの報告と整合する。(69) 一方で、LiBr を 100 mM 以上添加した場合には、塩析効果により良溶媒中で SC-PEG の疎水ドメイン同士が会合したと推察される。塩析により、良溶媒中での N_{ass} が増大した結果、SC-PEG NP の粒子径が増大したと推察される。これまでの報告においても、LiBr 濃度の増加は、高分子—高分子間の相互作用を増大することが報告されている。(70) さらに、会合性分子であるリグニンを用いた貧溶媒析出法によるナノ粒子作製においても、イオン強度と pH によって溶液中でのリグニンの構造が変化することが報告されている。(71) 以上から、本結果は、これまでの報告と整合すると考えられる。

TFR に着目すると、これまでの報告では、貧溶媒析出法では、高い TFR または、高い Reynolds 数による混合は、NP の粒子径を小さくすることが報告されている。(72-74) ここで、Reynolds 数とは、流体混合の粘性と慣性力の支配度合を示す指標であり、混合速度が速いほど大きくなる数値である。報告されている結果は、TFR が大きい場合、良溶媒が素早く拡散するため、疎水ドメインに働く疎水化効果が小さくなり会合数が減少するため、粒子径が小さくなると推定される。本章の結果は、これらの報告とも整合する。

本章で検証した LiBr の良溶媒中での濃度と、TFR を変化させることを組み合わせることで NP の製剤特性を制御する方法においては、LiBr 濃度が高く、TFR が小さい場合において、 D_h と PdI_{NP} が増大することを明らかとした。ただし、検証した範囲における PdI_{NP} の絶対値は単分散とされる 0.2 以下となった。従って、本章で検証した 2 つの工程の工程パラメータを変動させる方法は、LiBr 濃度の変動のみまたは TFR の変動のみといった単一の工程パラメータの変動と比較し、より広い範囲で単分散な状態を保ったまま、 D_h を制御可能な方法であると考えられる。

SC-PEG NP の表面 PEG 密度は D_h とトレードオフの関係であることを解明した。(Figure 24C) 本結果は、 D_h の減少に伴って SC-PEG NP の比表面積は増大することから合理的な結果であると考えられる。SC-PEG 中の PEG 鎖が SC-PEG NP の表面へ露出している割合を表面 PEG 含量として定義したが、検証した作製条件においては、表面 PEG 含量は同程度であった。すなわち、表面に移行する PEG ドメインの割合は変化せず、表面積のみが変動因子となったため、 D_h と表面 PEG 密度が良く相関したと考えられる。(Figure 24C) これまでの報告においては、ブロック共重合体に疎水性のホモポリマーを添加することによって表面 PEG 密度を制御する方法を採用し、 D_h を増大、比表面積を低減させ、表面 PEG 密度を増大させている。(75) 本章での検証結果は、比表面積が表面 PEG 密度の制御因子であるという点で、これまでの報告と整合している。

ここまでの結果をまとめると、次に示すメカニズムで 2 つの工程パラメータは SC-PEG NP の製剤特性を変動させたと推察される。LiBr の良溶媒中での濃度増加は、SC-PEG の良溶媒中での会合を促進する。また、TFR の低減は、良溶媒の拡散速度を低減する。これらの工程パラメータの変化は、SC-PEG の会合数を増大させ、SC-PEG NP の D_h を増大させる。一方で、表面 PEG 含量には影響せず、比表面積が低減することで、SC-PEG NP の表面 PEG 密度は増大したと推察された。

他方、TAM の封入に着目すると、300 mM LiBr の添加は、 $DLC_{conv.}$ ならびに DLC_{SPE} を有意に低下させる。また、搭載した TAM の約半量は SC-PEG NP の表面に吸着していることが示唆される。(Figure 21) 本結果については、貧溶媒析出法における NP の形成機構と TAM の溶解度から説明可能であると考えられる。これまでの報告では、貧溶媒析出法は、次の 3 つの過程を経て、NP が形成されることが報告されている。(45)

- i. 良溶媒の拡散による、溶質の過飽和。
- ii. 過飽和のブレイクによる核形成。
- iii. 核の成長と、速度論的な会合の停止。

300 mM LiBr を添加した場合に、良溶媒中では、その見かけの相対分子量は、20 mM LiBr の 2.5 倍まで増大することが明らかとなった。(Figure 20 and Table 7) 本結果は、溶質である SC-PEG の過飽和の維持時間と核の成長時間が短縮されることが想定される。一方で、0~30 mM LiBr を含有する 10% DMF 水溶液中、すなわち良溶媒と貧溶媒を混合後の溶液組成における TAM の溶解度に LiBr の濃度依存的な変化はなく、すべての条件において、検出下限以下であったことから、TAM 自身の過飽和維持時間、核成長時間は LiBr 濃度によって変化していないことが推察される。さらに、SC-PEG NP を凍結乾燥し、その疎水ドメインの T_m を評価したところ、300 mM LiBr を良溶媒に添加し調製した SC-PEG NP の T_m はその他の調製条件の T_m よりも有意に高い結果となった。(Figure 25) 以上の結果から、300 mM LiBr を使用して調製した SC-PEG NP において、TAM の薬物搭載量が低値を示した理由として、SC-PEG の良溶媒中での会合度が増加したため、析出過程において、TAM が封入されるよりも先に PLA の結晶性が向上し、疎水化ドメインへの TAM への封入効率が低下したと推察した。

また、約半分の TAM が SC-PEG NP の表面に吸着している点についても、TAM の放出試験からその結果の妥当性が示されている。(Figure 22B) 試験後 24 時間までは、表面に吸着した TAM が放出しており、その後、48 時間から 96 時間においては、内包されている TAM が放出していると推察される。本結果は、PLGA-PEG NP からの疎水性薬物の放出挙動が、二相性を示しているこれまでの報告を再現していることから妥当であると考えられる。(76)

2.3.3 異なる工程パラメータで作製した SC-PEG NP の PK プロファイル, 組織分布

^{111}In -SC-PEG NP と ^{14}C -TAM の血漿中濃度推移は 2-コンパートメントモデルに従った。(Figure 26) これは、投与初期において、細網内皮系や貪食細胞をはじめとするクリアランスシステムへ分布が起こり、飽和したためと推察される。 $NP_{Dense-Large}$ は $NP_{Sparse-Small}$ と比較して、 ^{111}In -SC-PEG NP と ^{14}C -TAM の血漿中放射活性—時間 AUC は増大し、肝臓と脾臓への移行量は、低下した。(Figure 26, Table 8) 本結果は、表面 PEG 密度が高いことが寄与していると考えられる。表面 PEG 密度が高いことで、PLA の疎水表面が覆われ、血漿中からのクリアランスを低減し、肝臓、脾臓への移行量が低減したと推察される。これまでの研究においても、表面 PEG 密度が高い NP は、プロテインコロナと呼ばれる、NP の周辺へ

のタンパク質の吸着を抑制し、血中からのクリアランスを抑制することが報告されている。(75, 77)

粒子径については、 $NP_{Dense-Large}$ と $NP_{Sparse-Small}$ では、61 nm と 105 nm であり、この差は、RES のような貪食機構への認識に重要でないとの報告もなされている。(75, 78) 一方で、RES の認識に対する NP の粒子径依存性も報告されている。(79, 80) これら報告の矛盾点は、主に 2 つの要因に起因すると考えられる。1 つは、肝臓における生理学的な血管構造である。マウス肝臓における有窓内皮の開口は 150 nm 程度であることが報告されている。(81) 本章における SC-PEG NP の D_h はこの開口部よりも小さいため、作製した SC-PEG NP は、有窓内皮を通過し、RES による認識を回避したと考えられる。2 つ目は、プロテインコロナの形成である。プロテインコロナが形成した NP は、RES による認識を受けやすくなることが報告されている。(82) これまでの報告は、 D_h と表面 PEG 密度の交互作用を考慮もしくは評価していないものがほとんどであるため、 D_h と組織移行性に関して、矛盾する結果が報告されていると考えられる。本章での検討においては、それらの交互作用を評価、解明し、体内動態に与える影響を検証した。 $NP_{Sparse-Small}$ においては、その疎水表面にタンパク質が吸着し、その結果、RES が存在する肝臓や脾臓への分布が増加したと推察される。 D_h と表面 PEG 密度の影響を明確とするためには、どちらかの因子を固定した検証が必要であると考えられる。これまでに、NP の粒子径と表面 PEG 密度をそれぞれ変更し、体内動態への影響を確認している報告では、粒子径の影響よりも、表面 PEG 密度の影響が大きくなることが示唆されている。(75) 以上から、表面 PEG 密度の影響を強く受けた可能性が考えられた。本章での結果は、SC-PEG NP の製剤特性、特に表面 PEG 密度が血漿中からのクリアランスと肝臓、脾臓へのクリアランスに影響することを示唆している。以上から、表面 PEG 密度が、潜在的な CQA となる可能性があることを明らかにした。

2.4 小括

Figure 27 に本章での検証結果の小括を図示した。本章では、SC-PEG NP の製剤特性を適切に制御する方法として、一般的なプロセスパラメータである温度や TFR に加えて、新たに、良溶媒中への LiBr の添加を検証した。プロセス中の温度を PEG ドメインの T_m より高温とした場合に、SC-PEG NP の粒子径分布は均一となり、表面 PEG 密度も増大した。LiBr の良溶媒への添加においては、LiBr の濃度依存的に、SC-PEG が会合し、その結果として、SC-PEG NP の D_h は増大した。LiBr の良溶媒への添加と、TFR の制御により、表面 PEG 密度を D_h の変化に伴う比表面積の変動によって広範囲に制御可能であることを明らかにした。一方で、300 mM LiBr の添加は、TAM の封入率を低下させることが明らかとなった。最後に、工程パラメータを 20 mM LiBr/TFR 8 mL/min または、100 mM LiBr/TFR 3 mL/min として作製した SC-PEG NP の PK プロファイルと組織中分布は、100 mM LiBr/TFR 3 mL/min として作製した SC-PEG NP において高い血漿中 AUC、低い肝臓、脾臓中分布を示した。以上の結果から、本章で検証した温度、TFR、良溶媒中 LiBr の工程パラメータを組み合わせることで、SC-PEG NP の D_h ならびに表面 PEG 密度を広範囲に制御可能であることを解明した。さらに、作製時の工程パラメータの異なる SC-PEG NP の PK プロファイルと組織

中分布が変化することも合わせて明らかとした。本章での検証結果は、PLA-PEG NP の製剤特性の制御幅の広い製法設定ならびに重要品質特性の制御に向けて有益な基礎的知見を提供すると考えられる。

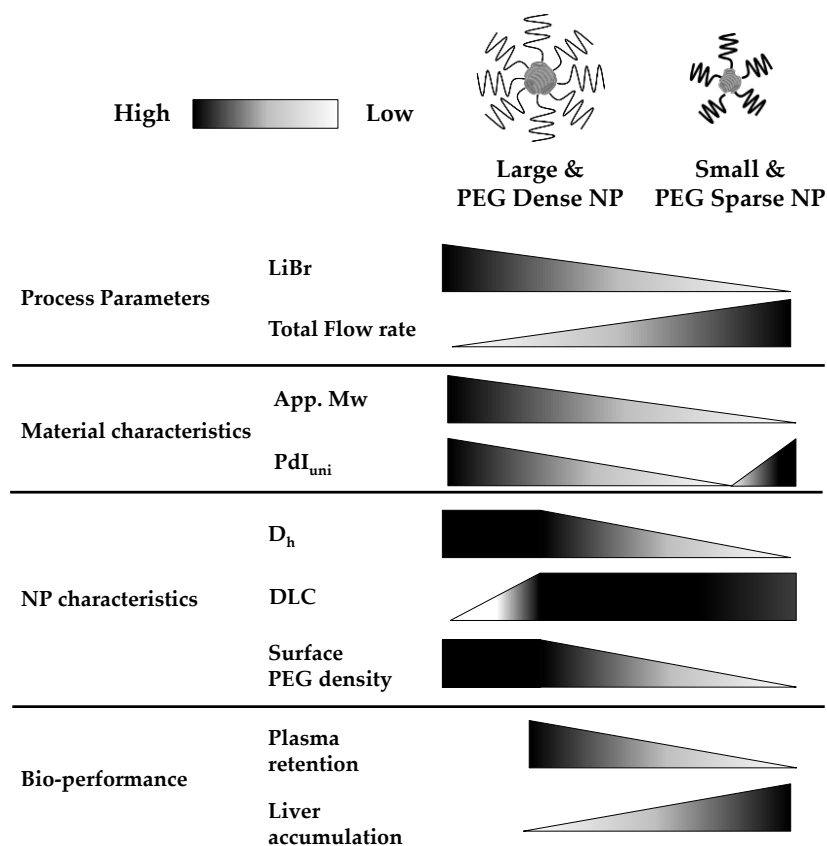


Figure 27 Schematic summary of the relationship between process parameters in the preparation of NPs. (Ogawa et. al., *Pharmaceutics.*, 2022, 14, 568, Figure 8)

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

3.1 緒言

Active targeting 型の NP についても、近年その研究開発が活発化しており、基礎研究をはじめ、多くの報告がなされている、(9-11) Active targeting 型の NP は、その表面に標的化素子を修飾したものが一般的であり、標的化素子としては、抗体、ペプチド、核酸、低分子化合物などが使用され、標的臓器、標的細胞または標的分子に対して結合特異性を持つものが汎用される。これら active targeting 型の NP は、標的外臓器への分布を低減し、標的臓器もしくは、細胞への分布を増大させることで、有効性、安全性の高い治療を達成する。(83, 84) 多くの非臨床試験における active targeting 型 NP に関する報告と有望な結果が示されている一方で、臨床試験に進んでいるものの数は限られている。(9, 10)

第2章でも触れたが“プロテインコロナ”という概念が提唱され、近年その研究が盛んにおこなわれている。プロテインコロナは生体媒体 すなわち血清や間質液中において、NP の周辺にタンパク質が吸着する現象を指す。薬物動態学的な観点では、プロテインコロナが形成した NP は、組織移行性が変化することも報告されている。(85-87) 高分子型 NP においても、プロテインコロナの形成により NP は、血中から速やかにクリアランスされ、肝臓、脾臓への分布を増大させることが報告されている。(76, 88) 他方で、active targeting 型 NP に及ぼすプロテインコロナの影響を考えた場合、プロテインコロナは、NP 表面の標的化素子を被覆、遮蔽し、結合活性を低下させることも報告されている。(89, 90) Active targeting においては、血中からのクリアランスと標的への親和性のバランスが、重要であることが報告されているため (91, 92)、NP へのプロテインコロナの形成を低減させることは、targeting 効率を向上させることに直結すると考えられる。さらに、規制面からプロテインコロナを考えた場合、各国当局から発刊されている NP 型 DDS 製剤の開発に関するガイドラインの中でも、血清耐性の評価が要求、推奨されており、血清中における NP の挙動評価は、製剤特性の解析や保存安定性評価と同様に医薬品開発及び規制面においても重要となっている。(15-17)

第1章ならびに第2章では、TAM を搭載した SC-PEG NP がその結晶性に起因して、良好な表面 PEG 密度を示し、その結果、血漿中クリアランスを低減することを明らかにしてきた。また、著者の所属する京都薬科大学 薬剤学分野では、アミノ酸誘導体を用いた酸性ペプチド素子を用いた効率的な骨標的化システムの開発に取り組んできた。(93-95) そこで、本章では、active targeting 型 NP のプロテインコロナ形成及び保存安定性に及ぼす表面特性の影響を評価し、標的指向化システムを最適化することを目的に検討を行った。最適化の方法として、次の2つを検証した。一つ目は、NP の比表面積の低減を目的として、stereocomplex を形成する疎水性 PLA ホモポリマーを SC-PEG NP の作製工程において良溶媒中に添加し、疎水コアのサイズ増大を指向した。二つ目は、プロテインコロナの形成を低減する新たな標的化素子のデザインである。NP の表面を双性イオン性の官能基や高分子、すなわち同一分子内にアニオン性の官能基とカチオン性の官能基を両方有するもので被覆することで、プロテインコロナの形成を低減する報告がなされている。(96, 97) しかし、標的指向化素子そのものを双性イオ

ン化する方法は、これまでに検証されていない。著者は、骨の主要構成成分であるハイドロキシアパタイト (HAP) に結合することが報告されているアミノ酸を基盤とする標的化素子として、オリゴアスパラギン酸に着目した。(98-100) オリゴアスパラギン酸の一種であるオクタアスパラギン酸 (D8) について、イオン性の異なる二つの誘導体を用いて検証を行った。一方は、D8 にグリシン (G) 8 残基とシステイン (C) を結合した D8G8C で、アニオン性誘導体 (Ani. pep.) とした。もう一方は、D8 にリシン (K) 8 残基と C を結合した D8K8C で、双性イオン誘導体 (Zwi. pep.) とした。これらのペプチド誘導体をチオール-マレイミドによるマイケル付加を用いて SC-PEG NP の表面に任意の割合で修飾した。作製した骨標的化ペプチド素子修飾 SC-PEG NP について、構築した特性解析手法を用いて、構造パラメータを解析し、保存安定性とプロテインコロナ形成に及ぼす構造パラメータの影響を解析した。さらに、血清存在下での HAP への結合活性と TAM の放出についても評価し、active targeting 型デリバリーシステムの最適化を行った。一連の検証により、active targeting 型 PLA-PEG NP の血清耐性と保存安定性に影響を及ぼす製剤特性を解明した。

3.2 結果

3.2.1 PLA-PEG-Maleimide (PDLA-PEG-Mal ならびに PLLA-PEG-Mal) と PLA ホモポリマー (PDLA ならびに PLLA) の合成

合成した PDLA-PEG-Mal ならびに PLLA-PEG-Mal の M_n とマレイミド残基の導入効率を Table 9 に示す。また、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Figure 28A と Figure 28B に示す。PLA の M_n は理論値を示し、マレイミド残基の導入もほぼすべての PLA-PEG に導入されていることを確認した。

PLA ホモポリマーの SEC-RI クロマトグラムを Figure 28C に示す。合成したホモポリマーは単峰性であることが確認された。

Table 9 Molecular weight and maleimide conjugation efficiency of synthesized PLA-PEG-Mal

	M_n^a		Maleimide conjugation efficiency ^a
	PEG	PLA	%
PDLA-PEG-Mal	5000	12109	102
PLLA-PEG-Mal	5000	12545	95.0

a: Calculated by $^1\text{H-NMR}$

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Table S1)

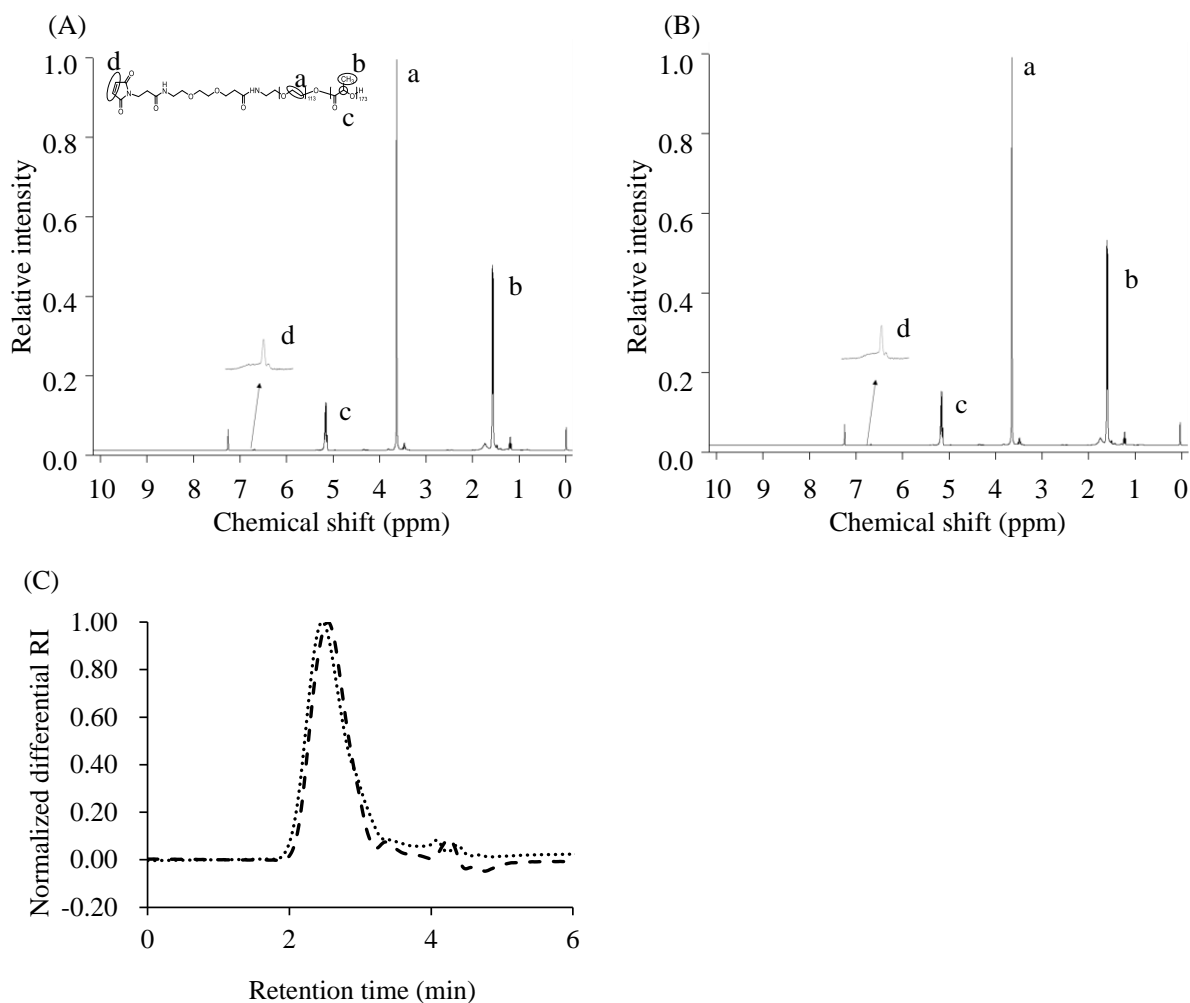


Figure 28 Characterization of synthesized polymers.

Figure 28A and B show ¹H-NMR spectra of PDLA-PEG-Mal and PLLA-PEG-Mal. The following chemical shifts were assigned: (a) 3.64 ppm, (CH₂-CH₂-O)_n of polyethylene glycol; (b) 1.60 ppm, CH₃ of polylactide; (c) 5.18 ppm, CH of polylactide; and (d) 6.70 ppm, HC=CH of maleimide. Figure 28C shows the SEC-RI chromatograms of the PDLA homopolymer (dotted line) and PLLA homopolymer (dashed line).

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure S2)

3.2.2 SC-PEG NP の製剤特性に及ぼす PLA ホモポリマー添加の影響

Table 10 に PLA ホモポリマーを添加して調製した SC-PEG NP (NP_{PLA/PLA-PEG}) ならびに添加せずに調製した SC-PEG NP (NP_{PLA-PEG}) の製剤特性値を示す。NP_{PLA/PLA-PEG} の TAM の封入率、DLC ならびに D_h は NP_{PLA-PEG} と比較して有意に高い値を示した。PDI は 0.2 以下となり、いずれの NP も単分散となった。形状比である R_g/R_h 比は NP_{PLA/PLA-PEG} で有意に小さくなり、NP_{PLA-PEG} と比較しコンパクトな構造となっていることが確認された。表面 PEG 密度は、NP_{PLA/PLA-PEG} において有意に高い値を示した。(Figure 29A) NP へのタンパク質の吸着量、すなわちプロテインコロナは、NP_{PLA/PLA-PEG} では、NP_{PLA-PEG} と比較し低値を示した。(Figure 29B) さらに、

マウス血清中における TAM の初期放出量は、NP_{PLA/PLA-PEG} において、有意に低下した。マウス血清中においては、初期放出後、24 時間まで、TAM 放出は確認されなかった。(Figure 30) 以上の結果から、以降の検討では、NP_{PLA/PLA-PEG} を使用して、標的化素子の検討を行った。

Table 10 Characteristics of prepared NPs w/ or w/o addition of PLA homopolymers

	EE ^a (%)	DLC ^b (wt%)	D _h (nm)	PdI	R _g /R _h ^c
NP _{PLA-PEG}	30.9±4.2	3.85±0.36	51.3±0.3	0.174±0.02	0.793±0.04
NP _{PLA/PLA-PEG}	42.1±3.7*	5.73±1.29	119±1.5*	0.166±0.00	0.716±0.01*

Results are expressed as the mean ± standard deviation of three samples.

a: Encapsulation efficiency, b: Drug loading contents, and c: R_h were measured by DLS. R_h=D_h/2, *: $p < 0.05$ compared with NP_{PLA-PEG}.

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Table 1)

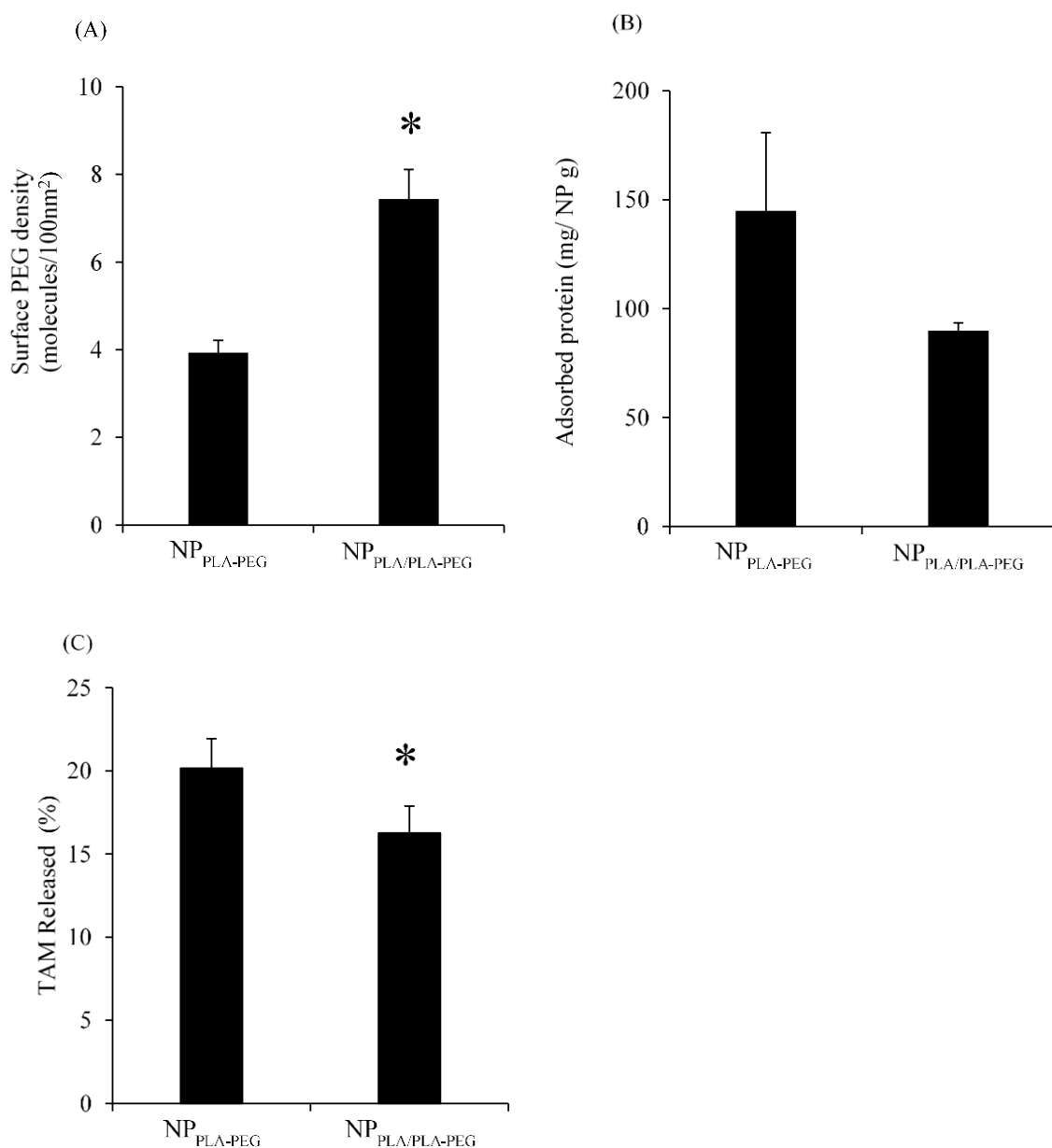


Figure 29 Surface PEG densities of prepared NPs and serum compatibilities.

Figure 29A, B, and C show surface PEG densities, normalized adsorbed proteins on the surface of NPs, and TAM initial release in the murine serum, respectively. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were performed independently three times; * $p < 0.05$ compared with NP_{PLA-PEG}.

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure 1)

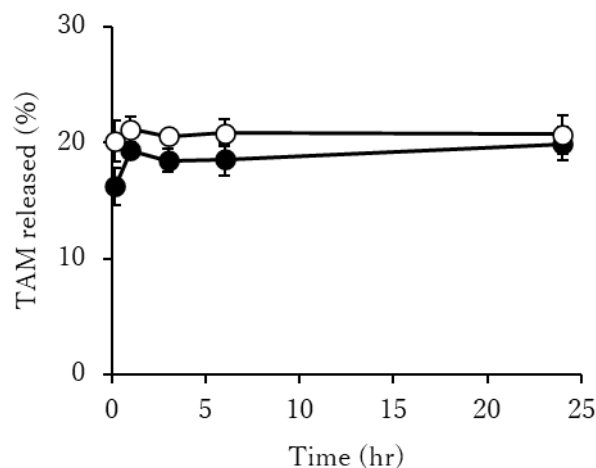


Figure 30 Release profiles of TAM in the murine serum. The symbols indicate closed circle: NPs with PLA homopolymers (NP_{PLA/PLA-PEG}) and an open circle: NPs without PLA homopolymers (NP_{PLA-PEG}). Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were performed independently three times.

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure S3)

3.2.3 NP_{PLA/PLA-PEG} 表面への骨標的化ペプチド素子修飾量

表面のマレイミド残基中に導入された骨標的化ペプチド素子の割合をペプチド修飾量 (MC) として示す。修飾に供した表面のマレイミド残基数に対する骨標的化ペプチド素子のモル分率に対して、MC をプロットしたものを Figure 31A に示す。Zwi pep. を修飾した場合、70 mol% まで直線的に MC は増加し、それ以上添加しても、MC は向上しなかった。一方で、Ani. pep. を修飾した場合、42 mol% までは直線的に増加したが、その後、MC の増大割合は低下したものの、140 mol% のペプチド素子を添加すると Zwi. pep. と同程度の MC を示した。MC に対して、ゼータ電位の値をプロットしたものを Figure 31B に示す。Zwi. pep. を修飾した NP (NP_{Zwi}) のゼータ電位は、-13.6 ~ -8.9 mV を示し、電氣的にわずかに負に帯電もしくは中性であった。対照的に、Ani. pep. を修飾した NP (NP_{Ani}) のゼータ電位は、-47.8 ~ -12.9 mV を示し、負電荷を帯びており、その度合いは、MC と対応していた。

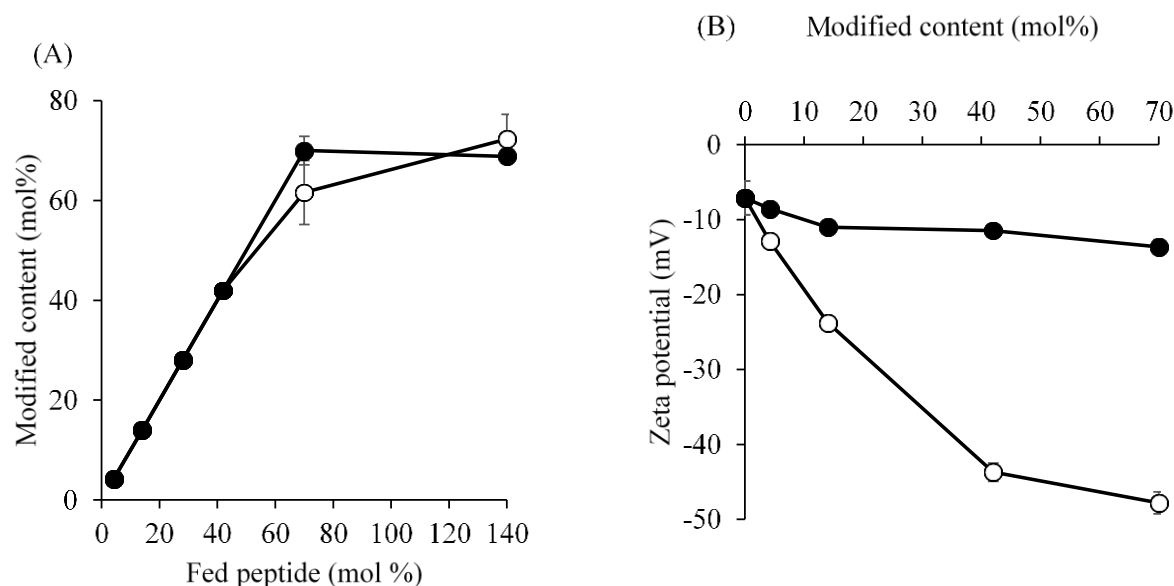


Figure 31 Peptide-modified contents (MC) and zeta potential (ZP) of peptide-modified NPs.

Figure 31A shows MC plotted as a function of feed peptide ratio to maleimide residues. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were independently performed three times. Figure 31B shows ZP plotted as a function of MC. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were performed independently three times. Closed circles indicate NPs modified with anionic peptide (NP_{Ani}), and open circles indicate NPs modified with zwitterionic peptide (NP_{Zwi}) in both figures.

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure 2)

3.2.4 骨標的化ペプチド素子修飾 NP_{PLA/PLA-PEG} の構造解析

Figure 32 に解析対象の NP の構造パラメータを図示した。Table 11 に PEG 鎖と骨標的化ペプチド素子に関して解析した構造パラメータを示す。調製した NP の表面 PEG 密度 (Γ_{PEG}) は 7.4~9.3 分子/100 nm² となった。隣り合う PEG 鎖との距離 (D_{PEG}) は全ての NP において、4.0 nm 前後となった。 D_{PEG} と PEG の Flory 径 ($2R_{\text{fPEG}}$) の比は、0.33 前後となり、NP の表面における PEG 鎖のコンフォメーションは brush 型であることが確認された。表面ペプチド密度 (Γ_{pep}) は MC に比例して増加し、NP_{Ani} では、1.6~8.5 分子/100 nm²、NP_{Zwi} では 1.4~7.8 分子/100 nm² であった。隣り合う PEG 鎖との距離 (D_{pep}) と骨標的化ペプチド素子の Flory 径 ($2R_{\text{fpep}}$) の比は、MC が増加し、最大量となった場合に 1 付近となり、 D_{pep} と $2R_{\text{fpep}}$ が等しくなることを確認した。

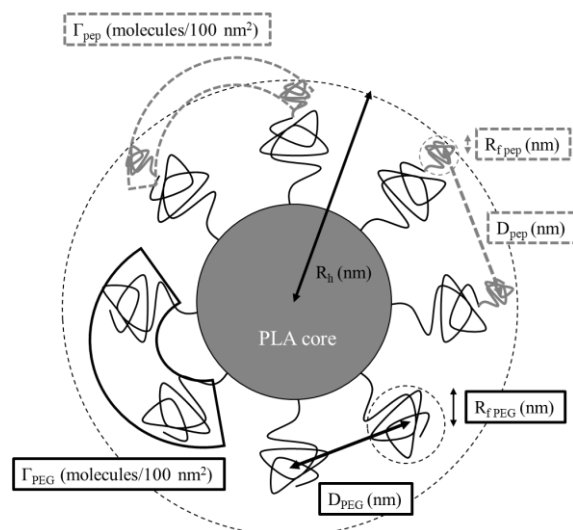


Figure 32 Schematic image of structural parameters.

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure 3)

Table 11 Structural parameters of peptide unmodified or modified NPs

NP type	MC ^a mol%	Γ_{PEG} molecules/ 100 nm ²	D_{PEG} nm	R_{fPEG} nm	$D_{PEG}/2R_{fPEG}$	Γ_{pep} molecules/ 100 nm ²	D_{pep} nm	R_{fpep} nm	$D_{pep}/2R_{fpep}$
NP _{PLA/PLA-PEG} -	-	7.44±0.18	4.14±0.05	0.35±0.00	-	-	-	-	-
NP _{Ani}	14%	9.35±0.42	3.69±0.09	0.31±0.01	1.63±0.07	8.85±0.20	2.22±0.10	2.00	
	42%	8.12±1.57	4.00±0.42	0.34±0.03	4.24±0.82	5.54±0.58	1.39±0.29		
	70%	7.46±0.21	4.13±0.06	5.97	0.35±0.00	6.49±0.19	4.43±0.06		1.11±0.03
NP _{Zwi}	14%	8.26±1.01	3.94±0.23	0.33±0.02	1.44±0.18	9.45±0.55	2.36±0.27		
	42%	8.24±0.28	3.93±0.07	0.33±0.01	4.30±0.15	5.44±0.09	1.36±0.05		
	70%	8.98±0.57	3.77±0.12	0.32±0.01	7.81±0.50	4.04±0.13	1.01±0.06		

a: modified content

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Table 2)

3.2.5 骨標的化ペプチド素子修飾前後の安定性ならびに保存安定性

調製した NP の保存安定性は DLS ならびに SEC-MALS を使用して評価した。(Figure 33) Zwi. pep. を 14 mol% もしくは 42 mol% の MC で修飾した場合の R_h は、修飾前後で有意に増大した。その他の NP については、 R_h に変化は認めなかった。対照的に、 R_g は、修飾前後で変化を認めなかった。骨標的化ペプチド素子修飾後の NP_{Zwi} の PdI_{NP} はそのほかの NP と比較して増大する傾向を示した。

R_h は 2-8 °C にて、4 週間保存した場合に、骨標的化ペプチド素子を修飾した NP でわずかに増大傾向を示した。しかしながら、 R_g においては、MC 14 mol% NP_{Zwi} と MC 42 mol% NP_{Zwi} を除いて、変化はなかった。MC 14 mol% NP_{Zwi} と MC 42 mol% NP_{Zwi} では、 R_g は有意に増大した。 $(p=2.9\times 10^{-5}, 4.6\times 10^{-4})$

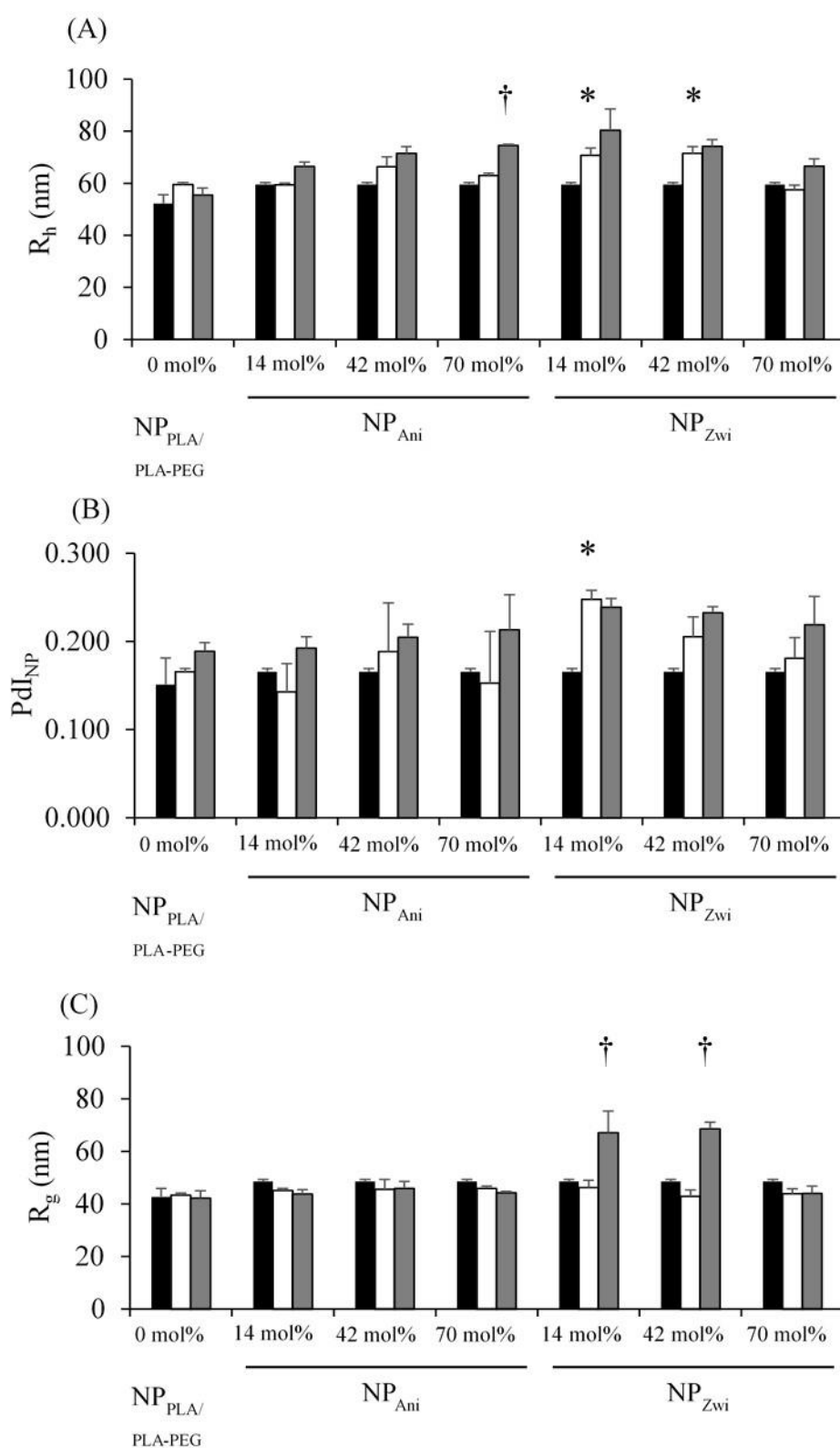


Figure 33 Stability of prepared NPs during conjugation and shelf storage.

Figure 33A, B, and C show the Rh, Pdl, and Rg of the NPs, respectively. The results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. Experiments were performed independently three times.

Closed bars indicate NPs before conjugation, open bars indicate quenched or modified NPs before the shelf life, and gray bars indicate NPs after storage at 2–8 °C for 4 weeks. * $p < 0.05$, compared with before conjugation. † $p < 0.05$, compared with before storage.

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure 4)

3.2.6 骨標的化ペプチド素子修飾 NP のプロテインコロナの形成評価と血清中での TAM の放出

Figure 34A に、NP の重量で正規化した吸着したタンパク質量を示す。吸着したタンパク質量は、骨標的化ペプチド素子の修飾により低減した。同一の MC で比較した場合、NP_{Ani} の吸着タンパク量は、NP_{Zwi} のそれと比較して増大傾向を示した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による吸着タンパク質の分離においては、60-70 kDa のタンパク質が NP_{Ani} においてより多く存在した。(黒矢印、Figure 34B) タンパク質量による NP へ吸着したタンパク質量と、SDS-PAGE の蛍光シグナルには強い相関を認めた。(R²=0.974, Figure 35) また、NP_{Ani} にて優位に結合するタンパク質の蛍光強度は、NP_{Zwi} において低値を示した。(Figure 34C)

TAM の血清中での放出を MC 70 mol% の NP_{Ani} ならびに NP_{Zwi} を用いて評価した。(Figure 34D) 放出される TAM は、ペプチドの修飾により、有意に低下した。(p=4.9×10⁻⁴, 8.2×10⁻⁴) 検証した 3 種類の骨標的化ペプチド素子修飾 NP の中では、NP_{Zwi} が、最も低い放出量を示した。

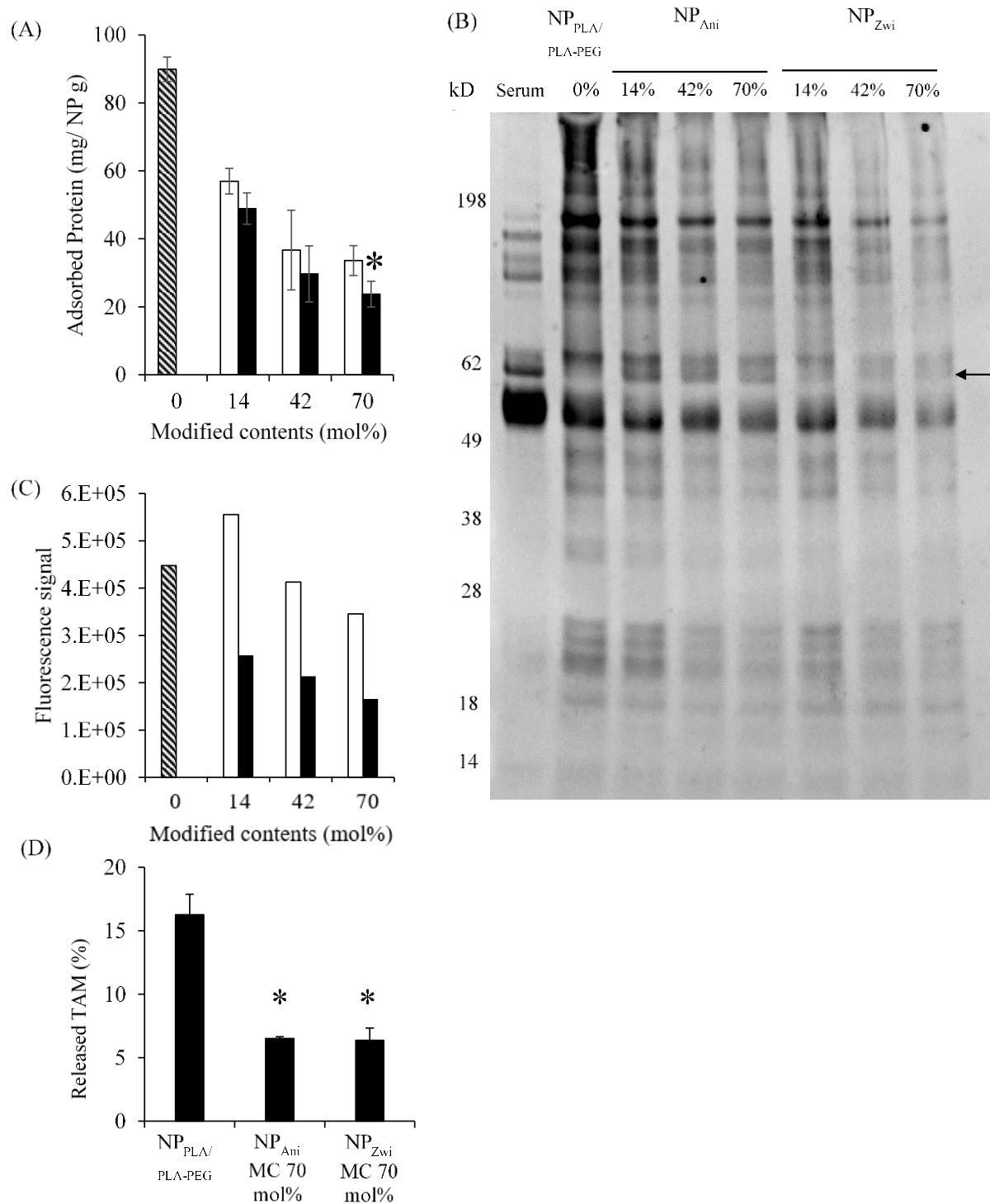


Figure 34 Protein adsorptions on the surface of prepared NPs.

Figure 34A represents protein concentrations normalized by NPs' weight. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were performed independently three times. Hatched, open, and closed bars indicate NP_{PLA/PLA-PEG}, NP_{PLA/PLA-PEG} modified anionic peptide (NP_{Ani}), and NP_{PLA/PLA-PEG} modified anionic peptide (NP_{Zwi}), respectively. * $p < 0.05$ compared to NP_{Ani}. Figure 34B shows the SDS-PAGE gel image obtained with fluorescence gain. Serum was diluted 3,000 times

and used as a control. The arrow symbol represents the protein band predominantly adsorbed on NP_{Ani}. Figure 34C represents the fluorescence signal of approximately 60–70 kDa protein band. Results are expressed as the fluorescence signals with background signals subtracted. Hatched, open, and closed bars indicate NP_{PLA/PLA-PEG}, NP_{Ani}, and NP_{Zwi}, respectively. Figure 34D shows TAM's initial release in the murine serum. Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were performed independently three times. * $p < 0.05$, compared to NP_{PLA/PLA-PEG}. (Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure 5)

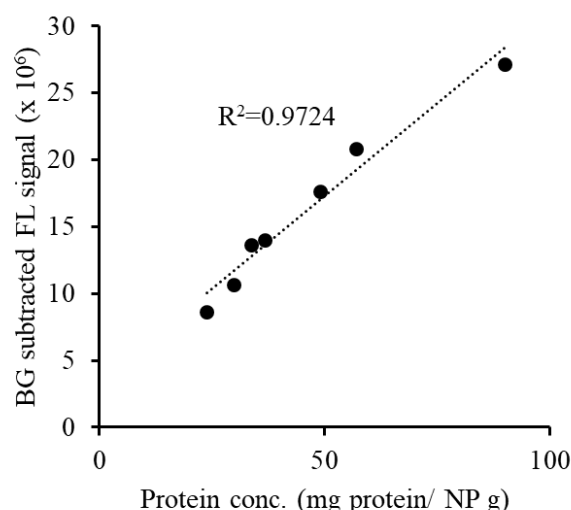


Figure 35 Correlation of protein concentrations and SDS-PAGE fluorescence signals. SDS-PAGE whole fluorescence signals are plotted as a function of protein concentration. (Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure S4)

3.2.7 血清を含む媒体中での HAP への骨標的化ペプチド素子修飾 NP の結合活性

Figure 36 にマウス血清存在下、非存在下における HAP への NP の結合活性を示す。MC 14 mol%とした NP に着目すると、血清非存在下における NP_{Zwi} は、NP_{Ani} と比較し有意に高い結合活性を示した。(Figure 36A) 血清存在下においては、NP_{Zwi} ならびに NP_{Ani} の両方の結合活性が有意に低下した。血清存在下、MC 42 mol%ならびに 70 mol%の NP においては、HAP/NP 比率が高い場合に NP_{Zwi} は NP_{Ani} と比較して有意に高い結合活性を示した。骨標的化ペプチド素子を修飾していない NP_{PLA/PLA-PEG} の HAP への結合活性を Figure 37 に示す。骨標的化素子非特異的な HAP への結合は、血清非存在下で約 20%、血清存在下で約 10%であった。

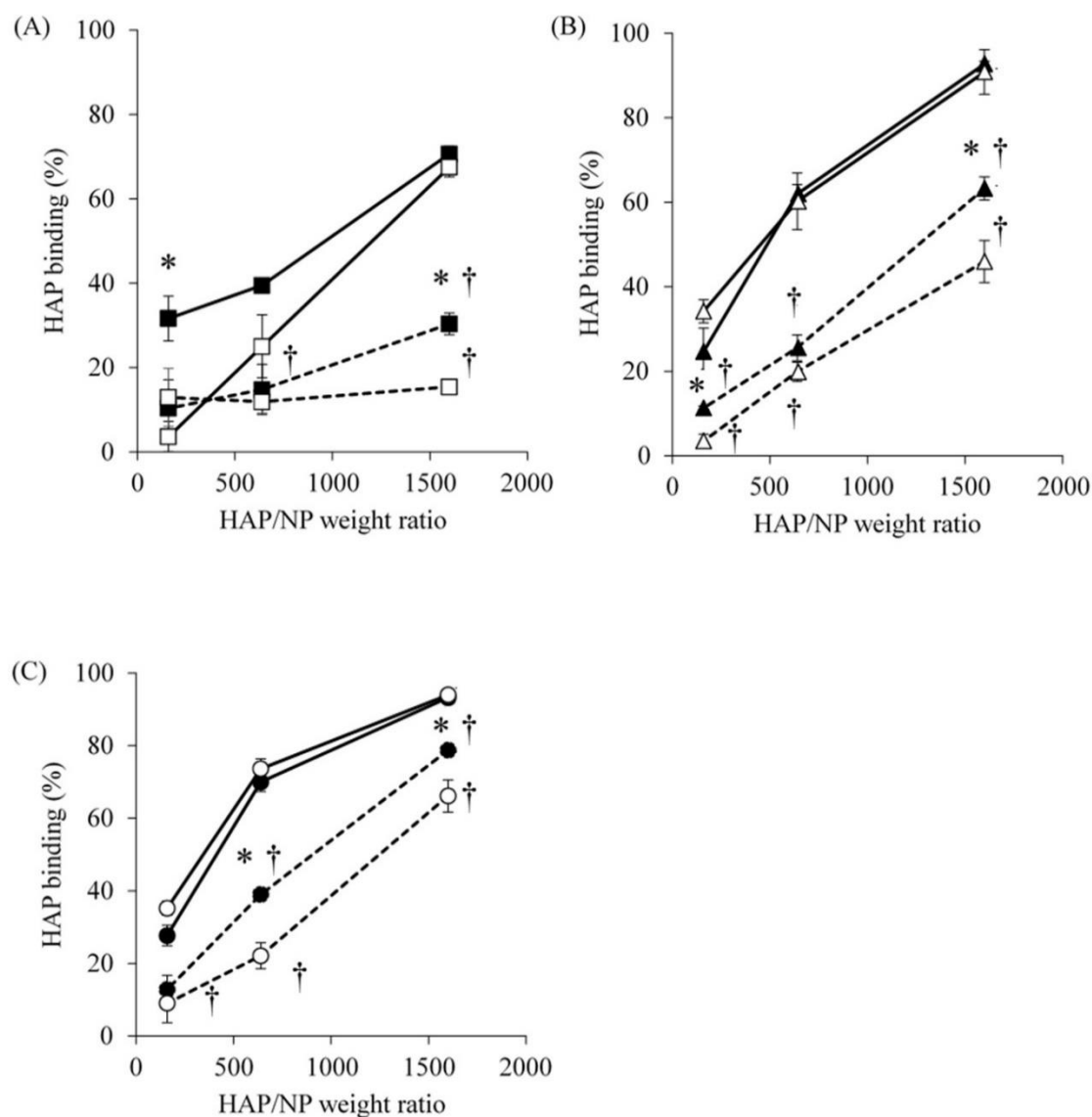


Figure 36 HAP binding assay with or without the murine serum

Figure 36A, B, and C represent the HAP binding % of modified contents of 14 mol% NPs, 42 mol% NPs, and 70 mol% NPs, respectively. The results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. Experiments were performed independently three times. Dashed lines and solid lines indicate the medium with and without murine serum, respectively. Open and closed symbols indicate anionic peptide-modified NPs and zwitterionic peptide-modified NPs, respectively. * $p < 0.05$, compared to NP_{Ani}; † $p < 0.05$, compared to without serum.

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure 6)

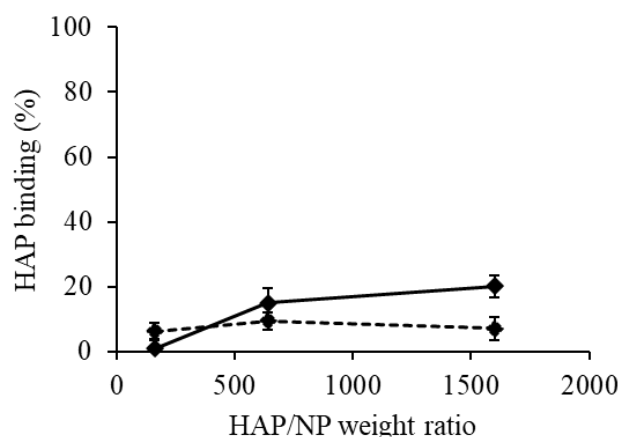


Figure 37 HAP binding of peptide-unmodified NPs with or without the murine serum.

Results are expressed as the mean \pm standard deviation of three samples. The experiments were performed independently three times. Solid and dashed lines indicate medium without and with the murine serum.

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure S5)

3.3 考察

3.3.1 SC-PEG NP への stereocomplex 形成 PLA ホモポリマーの添加

Stereocomplex を形成する PLA ホモポリマーを調製段階において良溶媒に添加したところ、SC-PEG NP の D_h は増加した。(Table 10) SC-PEG NP の表面 PEG 密度は、 D_h が大きい、すなわち、比表面積が小さい $NP_{PLA/PLA-PEG}$ で増大した。これまでに、PLLA-PEG NP の疎水コアに、PLLA ホモポリマーや poly(ϵ -caprolactone) を添加することで、 D_h が増大し、表面 PEG 密度が増大することが報告されている。(75, 88) 本結果は、これらの報告と整合している。さらに、ホモポリマーを添加しない $NP_{PLA-PEG}$ と比較して、ホモポリマーを添加した $NP_{PLA/PLA-PEG}$ の表面に吸着したタンパク質量は有意に低下した。(Figure 29) 本結果は、表面 PEG 密度が上昇したことにより、血清中のタンパク質の吸着が抑制されたと推察され、過去の報告とも整合する。(101, 102) 従って、疎水ホモポリマーを添加し、比表面積を低減するという方法論は、stereocomplex を形成する PLA においても機能することを確認した。 $NP_{PLA/PLA-PEG}$ におけるマウス血清中での TAM の初期放出量は、 $NP_{PLA-PEG}$ と比較して低下し、その後 24 時間まで、ほとんど血清中では放出されなかった。(Figure 29C, Figure 30) 本結果は、血清に NP が投入された際に、疎水性の PLA コアと水相の界面に封入または吸着している TAM が血清タンパク質と相互作用した結果、放出されたと推察される。比表面積がより大きい $NP_{PLA-PEG}$ においては、血清中のタンパク質が NP の表面とより多く相互作用することが想定されるため、表面に吸着した TAM を可溶化し、放出させたと考えられる。これまでに、疎水性薬物である camptotecin を内包する NP の血清中における放出挙動の予測において、血清中での camptotecin のタンパク結合と NP からの放出が逐次反応と仮定した場合に、実測値に対して予測精度が向上することが報告されている。(103) これは、溶解度が低い疎水性薬物の血清中での放出に、血清タンパク質が重要な役割を果たすことを示唆しており、本研究の結果とも整合する。ま

た、90%血清中における TAM の溶解度は試験条件の濃度よりも十分高く、本試験条件においては、sink 条件となっていると推定される。それにも関わらず、初期放出後から 24 時間まで TAM がほとんど放出されない理由としては、疎水コア内部に封入されている TAM の PLA ドメインへの親和性が、90%血清よりも高いと推定される。これまでの報告では、マウス血清中において、PLA コアが加水分解し、薬物を放出するには 15 日以上を要することならびに疎水性の薬物は、血清中においてアポリポタンパク質に速やかに移行することが報告されている。(104, 105) 本章における結果もこれらの報告と整合する。一方で、本章における放出性評価の期間は、24 時間までの評価となっているが、SC-PEG NP は静脈内投与後 24 時間でそのほとんどがクリアランスされるため、放出性評価の期間としては、妥当であると考えられる。(Figure 14)

3.3.2 骨標的素子を修飾した SC-PEG NP の物理化学的及び構造パラメータと保存安定性

NP_{Ani} のゼータ電位は MC の増大に伴って、負電荷を帯びた一方で、NP_{Zwi} のゼータ電位は、MC に依らず中性の値を示した。(Figure 31B) 本結果は、標的化素子ならびに構成成分の物理化学的な性質が表面物性を規定するというこれまでの報告とも整合する。(94, 106) SC-PEG NP の構造パラメータ解析では、調製したすべての NP において、PLA コアに拘束されている PEG 鎖の隣り合う距離 (D_{PEG}) と拘束されていない分散系における PEG 鎖の Flory 径 ($2R_{f, PEG}$) との比が 1 未満であることから (Table 11)、PEG 鎖は、PLA の疎水表面に固定化され、垂直方向に伸展していることを示し、SC-PEG NP 表面の PEG 鎖のコンフォメーションは brush 型であると推定された。(88) 一方で、両骨標的化ペプチド素子の MC は 70 mol% 程度で飽和した。(Figure 31A) PEG 鎖に拘束されている隣り合う骨標的化ペプチド素子の距離 (D_{pep}) と拘束されていない分散系における骨標的化ペプチド素子の Flory 径 ($2R_{f, pep}$) との比が MC 70 mol% では、1 付近となった。本結果は、隣り合う骨標的化ペプチド素子同士の距離と、骨標的化ペプチド素子自身の直径が等しいことを示しており、骨標的化ペプチド素子の NP への修飾は、NP の表面が完全に被覆されるまで修飾されることを示している。NP を形成後に、表面に標的化素子を修飾する方法においては、これまでに、ペプチドと nanobody を NP の表面に修飾する方法論が報告されており、既報においても NP の表面を完全に覆うまで標的化素子が修飾されることが報告されている。(107) これらの報告は、本章の結果とも整合する。

MC14 mol% または 42 mol% の NP_{Zwi} の D_h , PdI_{NP} , R_g に着目すると、保存安定性が悪いことが確認された。(Figure 33) MC 14 mol% または 42 mol% の NP_{Zwi} においては、Zwi. pep. の密度が、MC 70 mol% の NP_{Zwi} と比較して小さいため、D8 ドメインと K8 ドメインが静電的に相互作用し、凝集が発生したと推察される。双性イオン同士の静電的相互作用においては、双性イオン脂質修飾ポリマーを用いたエンドソーム膜との相互作用が報告されている。(108) 本章で検証した標的化素子においては、イオン性相互作用する官能基が報告されているものよりも多いために、より影響が強くなったことが推定される。反対に、NP_{Ani} においては、MC に依らず物理的に安定なプロファイルを示した。これらの結果は、アニオン性リポソームは双性イオン性リポソームよりも分散安定性が高いというこれまでの報告とも整合する。(109) MC 70 mol% の NP_{Zwi} においては、その表面が Zwi. pep. で密に被覆されているため、NP 同士

の凝集を抑制したと推察された。

3.3.3 血清中における NP へのプロテインコロナの形成と HAP への結合活性

NP_{PLA/PLA-PEG} への骨標的化ペプチド素子の修飾によって、SC-PEG NP 表面へ結合するタンパク質量は 30%低減した。(Figure 34) NP の構造パラメータ解析から、PEG 鎖は brush 型のコンフォメーションを取っているものの、これまでの報告から、その分子運動性は高く、PEG 鎖が運動することで、疎水表面が露出しうることが想定される。(88, 110) そのため、ペプチド素子の NP への修飾により、立体障害が大きくなり、タンパク質の疎水吸着が抑制されたと推察された。また、タンパク質吸着量が 20%低減すると、血漿中半減期が 2 倍となるということも報告されている。(88) 以上から、本章における NP へのタンパク質吸着の抑制は体内動態を改善することが期待される。

NP_{Zwi} においては、NP_{Ani} と比較して吸着したタンパク質量は低減し、NP_{Ani} においては、特異的に吸着するタンパクが存在することが確認された。(Figure 34A, Figure 34B) 本結果は、Zwi pep. の antifouling 効果に起因すると推察される。Antifouling 効果とは、双性イオン性の官能基により、水和相において、強固な水素結合を形成し、タンパク質等の生体分子との相互作用を抑制する作用である。(111, 112) 量子ドット (QDs) を用いて表面をカチオン性、アニオン性、双性イオン性の高分子で被覆した場合に、双性イオン性高分子で被覆した QDs では、プロテインコロナの形成が抑制されており、本章での結果は、これまでの報告とも整合している。(113) NP_{Ani} で確認された 60~70 kDa 付近の優先的に結合するタンパク質に関しては、これまでにアニオン性の表面特性を示すナノ粒子において分子量が近いタンパク質の吸着が報告されている。QDs を用いた過去の報告において、補体の C3b alpha chain が双性イオン性の QDs と比較してアニオン性の QDs において特異的に結合することが報告されている。(114) また、表面電荷が異なる脂質ナノ粒子の報告においては、アニオン性の脂質ナノ粒子において、70 kDa 付近に特異的なバンドが観測されているものの、それらの吸着量が少量であるということから同定に至っていない。(115) 本章において観測された NP_{Ani} に特異的なタンパク質吸着も、潜在的に体内動態に影響する可能性はあるものの、その絶対量は小さく NP への影響は軽微であることが推察される。しかしながら、アニオン性骨標的化ペプチド素子がプロテインコロナの形成に及ぼす影響の機構解明としては、酵素消化法と液体クロマトグラフィー—質量分析計 (LC-MS/MS) を用いたペプチドマッピング等での吸着タンパク質の同定が有効であると考えられる。

こうした antifouling 効果は、骨標的化ペプチド素子を修飾した NP の血清中における TAM の放出性が抑制されたことにも寄与していると推察される。(Figure 34D) 骨標的化素子の結合により、タンパク質の吸着量が減少した結果、放出量が低減したと推察された。これまでの報告においても、疎水性蛍光分子を高分子ミセル内に封入し、その表面を双性イオン化した場合に、カチオン化やアニオン化した NP と比較し、ウシ血清中での蛍光分子の放出挙動が低減する傾向にあることが示されている。(116) 本結果もこれらの報告と整合する。

MC14 mol% における NP_{Zwi} の HAP への結合活性は NP_{Ani} と比較して有意に高くなった。(Figure 36A) HAP は不溶性のリン酸カルシウム塩であり、その表面には、アニオン性のリン酸

イオンとカチオン性のカルシウムイオンが配向することが報告されている。(117) また、骨標的化素子であるオリゴアスパラギン酸ペプチドにおける、HAP 結合機構は、アスパラギン酸のカルボキシル基とカルシウムイオンとの静電的相互作用であることが報告されている。(118) さらに、別の報告では、HAP に対するアミノ酸の結合を評価し、リシン残基も HAP に対して結合することが報告されている。(119) 本章における結果はこれらの報告と整合し、骨標的化ペプチド素子である D8 に K8 を結合させ双性イオン化することで、カルボキシル基だけでなく、アミノ基も HAP と相互作用することで、結合活性が向上すると推察された。また、マウス血清存在下における NP_{Zwi} の HAP に対する結合活性は、NP_{Ani} と比較して有意に高いことを確認した。(Figure 36B, 36C) 本結果は、NP_{Zwi} に対する吸着するタンパク質量が NP_{Ani} と比較して、少なかったため、骨標的化素子がタンパク質により遮蔽されなかったことならびに上述した、双性イオン化骨標的化素子が HAP に対して高い結合活性を持つことに起因すると推察される。HAP と血清タンパク質との相互作用については、これまでに、タンパク質の HAP に対する結合活性が報告されており、血清存在下では、HAP の表面にもタンパク質が吸着していることが推定される。(120) 実際に、NP_{PLA/PLA-PEG} の HAP への非特異的な吸着は、血清存在下で減少していることから、HAP の表面にタンパク質が吸着していることが示唆される。(Figure 37) そのため、HAP 表面に結合したタンパク質と結合活性の高い Zwi. pep. が交換される可能性も考えられる。これまでの報告においては、双性イオン化したビオチン修飾シリカ NP の血清存在下における標的細胞への取り込みは、非存在下と同等を示し、双性イオン化しなかった NP では低下することが明らかとなっていることから、双性イオン化により血清存在下において標的分子への結合活性が維持することは妥当であると考えられる。(121) 以上の結果は、本章において検証した双性イオン化骨標的化ペプチド素子が血清耐性を有し、結合活性を維持することを示している。

3.4 小括

SC-PEG NP の製剤特性や血清耐性に及ぼす NP の比表面積と骨標的化ペプチド素子の双性イオン化の影響について、詳細な特性解析手法に基づき評価した。Stereocomplex を形成する PLA ホモポリマーの添加は、SC-PEG NP の粒子径を増大させ、比表面積を低減した。その結果として、SC-PEG NP の表面 PEG 密度は増大し、SC-PEG NP に対するプロテインコロナの形成を低減させたとともに、血清存在下における TAM の放出を抑制した。骨標的化ペプチド素子は、SC-PEG NP の表面を密に覆うまで修飾された。双性イオン化骨標的化ペプチド素子の高密度での SC-PEG NP への修飾は、保存安定性の低下を抑制し、アニオン性ペプチド素子の修飾と比較して、結合活性を維持することを明らかにした。

本章では、SC-PEG NP の保存安定性及びプロテインコロナの形成に及ぼす骨標的化ペプチド素子を修飾した SC-PEG NP の構造パラメータの影響について解明した。すなわち、表面 PEG 密度ならびに骨標的化ペプチド素子の物理化学的性質とその修飾密度が、血清耐性と保存安定性に重要であることを示した。本知見は、骨標的化素子の新たな設計方法論となり得るとともに、SC-PEG NP の構造パラメータと製剤の安定性／血清耐性に対する関係性を解明

した点で、active targeting 型 NP 製剤の医薬品開発における品質特性解明に有用な基礎的知見を提供するものと考えられる。

結論

著者は、3章にわたり、PLA-PEG NP の特性解析手法を構築し、それらを体系的に活用して、PLA-PEG ブロック共重合体の原料特性や PLA-PEG NP の製剤特性を解析した。解析から得られる詳細な物理化学的特性に基づき、passive targeting 型デリバリーシステムの処方設計、製造法確立ならびに active targeting 型デリバリーシステムとして、骨標的指向型 PLA-PEG NP の血清耐性、製剤安定化に関する検討を行った。

第1章では、PLA-PEG ブロック共重合体の原料特性として、PLA ドメインの結晶性が PLA-PEG NP の表面 PEG 密度に強く影響を及ぼし、封入薬物である TAM の封入状態が変化すること明らかとした。さらに、PLA の結晶性、表面 PEG 密度と TAM の表面吸着量が血中滞留性を変動させうる製剤特性であることを解明し、SC-PEG NP が最も血中滞留性を向上可能であることを示した。

第2章では、SC-PEG NP の製剤特性の制御幅の広い製造方法確立のために、良溶媒中に LiBr を添加することを新たな工程パラメータとして検証した。良溶媒中への LiBr の添加により SC-PEG が良溶媒中で会合し、形成される SC-PEG NP の粒子径を変動させていることを解明した。さらに、工程パラメータとして、良溶媒中の LiBr 濃度と総流速を組み合わせることで、より広い範囲の粒子径制御が可能であった。応答局面を用いた解析の結果、粒子径と表面 PEG 密度は交互作用が存在し、トレードオフの関係であることを明らかとした。最終的に異なる工程パラメータにより作製した粒子径、表面 PEG 密度の異なる SC-PEG NP は血中滞留性及び組織移行性が異なることを示し、製剤作製時の工程パラメータと製剤特性ならびに体内動態との関連性を明らかとした。

第3章では、active targeting 型 SC-PEG NP の処方設計を行った。PLA ホモポリマーの添加は、SC-PEG NP の表面 PEG 密度を向上させた。その結果、SC-PEG NP へのタンパク質吸着の抑制し、血清中での TAM の放出を抑制させることを明らかとした。さらに、骨標的化ペプチド素子を双性イオン化し、SC-PEG NP の表面に密に修飾することにより NP 表面へのタンパク質の吸着を低減させ、血清存在下において骨への結合活性を維持することを見出した。さらに、製剤の保存安定性に関しても、凝集を抑制することを示した。

本研究では、複雑な DDS 製剤の医薬品としての開発課題となっている原料特性、製剤特性を解析可能な特性解析技術を確立した。加えて、PLA-PEG NP の薬物動態及び血清耐性に及ぼす製剤特性ならびに製造法、工程パラメータの影響を調査、解明した。以上の結果は、複雑なナノパーティクル型 DDS 製剤の重要品質特性の同定のための特性解析手法に有益な基礎的技術情報を提供できるとともに、製剤特性に基づく NP 型 DDS 製剤の開発の推進に貢献するものと考ええる。

第 1 章 実験の部

Exp.1 試薬、動物、実験方法

Exp.1.1. 試薬

Methoxy-polyethylene glycol (mPEG, 分子量 5 kDa) と O-(2-aminoethyl) polyethylene glycol (NH₂-PEG-OH, 分子量 5 kDa)、ポリソルベート 80、重水素クロロホルムと重水は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, US) から購入した。DL-lactide、L-lactide、臭化リチウム (LiBr)、2-エチルヘキサン酸スズ (II) (Sn (Oct)₂) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。D-lactide は Leap Labchem (Hangzhou, China) から購入した。Tamoxifen (TAM) は MP Biomedicals (Santa Ana, CA, US) から購入した。ジクロロメタン (DCM)、ジエチルエーテル、トルエン、ジメチルスルホキシド (DMSO)、塩酸、N, N-ジメチルホルムアミド (DMF, HPLC grade) は富士フイルム和光純薬株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。アセトニトリル (MeCN, HPLC grade) は関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide (Fmoc-OSu) は渡辺化学工業株式会社 (Hiroshima, Japan) から購入した。Diethylenetriamine-N, N, N', N', N'-pentaacetic acid (DTPA) 無水物は同仁堂化学株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。Solubene 350 は Perkin-Elmer (Kumamoto, Japan) から購入した。Clear-Sol I はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。¹⁴C-TAM [N-methyl-¹⁴C] は American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO, US) から購入した。¹¹¹Indium chloride ([¹¹¹In] InCl₃) は日本メジフィジックス株式会社 (Tokyo, Japan) から供与されたものを使用した。その他の試薬については、市販の特級試薬を用いた。

Exp.1.2. PLA-PEG ブロック共重合体 (PLA-PEG) の合成

PLA-PEG は mPEG 5 kDa を開始剤として、開環重合法により合成した。mPEG 1 g をナスフラスコに秤取し、オイルバスで 110 °C に加熱後、減圧した。1 時間脱水した後 DL-lactide、L-lactide または D-lactide を 1 g (5 kDa PLA の場合) もしくは 2.5 g (12.5 kDa PLA の場合) をナスフラスコに秤取し、触媒として Sn (Oct)₂ を 10 mg 加えた。オイルバスで 160 °C に加熱、溶解し 12 時間反応させた。反応物に 4 mL の DCM を加えて溶解させた後に、ジエチルエーテルに滴下し、精製した。精製後の各種 PLA-PEG は減圧乾燥し、-20°C で保管した。

PLA の分子量が 5 kDa 付近の PLA-PEG については、DL-体から構成される PLA-PEG は DL-PEG 5k-5k、D-体から構成される PLA-PEG は D-PEG 5k-5k、L-体から構成される PLA-PEG は L-PEG 5k-5k と表記し、PLA の分子量が 12 kDa 付近の PLA-PEG については、DL-体から構成される PLA-PEG は DL-PEG 12k-5k、D-体から構成される PLA-PEG は D-PEG 12k-5k、L-体から構成される PLA-PEG は L-PEG 12k-5k と表記した。

Exp.1.3. PLA-PEG の特性解析

DL-lactide から構成される PLA-PEG NP は DL-PEG NP、L-lactide から構成される PLA-PEG NP は L-PEG NP、stereocomplex を形成する PLA-PEG から構成される PLA-PEG NP は SC-PEG

NP と表記する。作製に用いた PLA-PEG の分子量については、末尾に 5k-5k または 12k-5k と表記した。

Exp.1.3.1 PLA-PEG の平均分子量 (M_n) と多分散性指数 (PdI_{uni}) の算出

M_n はプロトン核磁気共鳴スペクトル (1H -NMR) により算出した。各種 PLA-PEG 10 mg をポリプロピレンチューブに秤取し、重水素化クロロホルム 0.6 mL で溶解し、NMR (Bruker, AVANCE III 400 MHz, US) にてスペクトルを取得した。PLA の重合数、平均分子量は、mPEG のエチレンオキシドのケミカルシフト (3.6ppm) に対する PLA のメチル基のケミカルシフト (1.5ppm) の積分比から計算した。

PdI_{uni} は、サイズ排除クロマトグラフィー-示唆屈折率検出 (SEC-RI) より算出した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のシステムの構成を Table 12 に示す。

Table 12 Analytical method of SEC-RI

項 目	設定
System	Agilent 1100
RI detector	Wyatt Opti-lab 658 nm, cell temperature 25°C
Column	TSKgel α 5000 7.8 × 300 mm
Column oven temperature	40°C
Mobile phase	20 mM LiBr DMF
Gradient	Isocratic flow
Flow rate	1.0 mL/min.
Injection volume	100 μ L
Sample temperature	25 °C
Needle wash solvent	MeCN

試料の調製は、各種 PLA-PEG を 10 mg 秤取し、1 mL の移動相で溶解した。分子量校正用のポリエチレンオキシド (Agilent, US) も同様に調製を行い、HPLC で分析を行った。 PdI_{uni} の算出は、 μ 7 ソフトウェア (System instruments, Japan) を用いて、下記計算式より算出した。

$$PdI_{uni} = M_{wrel}/M_{nrel} \quad \cdot \cdot \cdot \text{Equation 1}$$

ここで、 M_{wrel} は相対重量平均分子量、 M_{nrel} は相対個数分子量を示す。

Exp.1.3.2 PLA-PEG の 2 次構造と結晶構造の確認

2 次構造の確認には、円偏光二色性スペクトル (CD, JASCO, J-805, Japan) を測定することで評価した。各種 PLA-PEG 3 mg をエッペンチューブに秤取し、1 mL の MeCN で溶解した。スキャン波長は 190~250 nm とし、スキャン速度は 300 nm/min とした。測定には 2 mm 幅の石英セルを用いた。

結晶構造の確認は、粉末 X 線回折 (XRD, Bruker, D8, US) を用いた。測定回折角 (2θ) は 5°~35°とした。

Exp.1.4. PLA-PEG NP の調製

PLA-PEG NP の調製には貧溶媒析出法を用いた。各種 PLA-PEG 30 mg をガラスバイアルに秤取し、DMF 0.15 mL で溶解した。Stereocomplex の形成を指向した NP の調製には、L-PEG と D-PEG を等量混合した。Tamoxifen (TAM) 14 mg を THF 1 mL に溶解した。DMF に溶解した PLA-PEG 溶液 0.15 mL と THF に溶解した TAM 溶液 0.15 mL を混合し、50°C に加熱した。(有機相；良溶媒) 蒸留水 1.8 mL (水相；貧溶媒) をスクリーバイアルに秤取し、1000 rpm で攪拌した。有機相 0.2 mL を水相に 60 mL/min の速度で滴下した。作成した溶液 1.5 mL を分画分子量 10 kDa (Repligen, Float-a-lyzer, US) の透析膜に入れ、室温で 300 mL の蒸留水で透析した。透析した NP 溶液は 0.45 μm の PVDF フィルター (Merck, Germany) でろ過し、使用するまで 2-8 °C で保管した。TAM を封入しない Blank NP に関しては、TAM を添加せず同様の方法で作製した。

Exp.1.5. BlankPLA-PEG NP、TAM 封入 PLA-PEG NP の特性解析

Exp.1.5.1 流体力学径 (D_h) と多分散性指数 (PdI_{NP}) の算出

D_h と PdI_{NP} は動的光散乱法 (DLS, Malvern, Zetasizer Nano ZS, UK) より算出した。調製した NP 10 μL をエッペンチューブに採取し、490 μL の 10 mM リン酸緩衝液 pH7.4 を希釈溶媒として加え、混合した。測定温度は 25°C、媒体粘度は 0.889 mPa·s とした。測定時に減衰器の選択番号が 7~9 とならない場合は、希釈媒体で希釈した。繰り返し測定回数は自動設定とし、10~15 回の繰り返し測定を実施した。 D_h と PdI_{NP} にはキュムラント解析法で算出した Z 平均粒子径と多分散性指数をそれぞれ使用した。

Exp.1.5.2 ゼータ電位の測定

ゼータ電位はレーザードップラー法 (Malvern, Zetasizer Nano ZS, UK) により算出した。調製した NP を PLA-PEG 濃度として 2 mg/mL に 10 mM リン酸緩衝液 pH7.4 で希釈した。希釈媒体の比誘電率は 7.8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ とした。積算測定回数は最大 100 回とした。

Exp.1.5.3 平均会合数 (N_{ass}) と回転半径 (R_g) の算出

N_{ass} と R_g はサイズ排除クロマトグラフィー-多角散乱検出 (SEC-MALS) により算出した。調製した NP を PLA-PEG 濃度として 5 mg/mL に蒸留水で希釈した。HPLC の測定条件を Table 13 に示す。

Table 13 Analytical method of SEC-MALS

項 目	設定
System	Agilent 1100
Multi-angle scattering detector	Wyatt Dawn/Helos
RI detector	Wyatt Opti-lab 658 nm, cell temperature 25°C
Column	Shodex SB-807 35 μ m, 8.0 \times 300 mm
Column oven temperature	25°C
Mobile Phase	Phosphate buffered saline pH7.4
Gradient	Isocratic flow
Flow rate	1.0 mL/min.
Injection volume	30 μ L
Sample temperature	25°C
Needle wash solvent	MeCN

多角散乱によるシグナルの解析には、Astra ソフトウェア (Wyatt, US) を用いた。NP の分子量と R_g は Berry's plot を作成することで算出した。算出には以下の式を用いた。

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{16\pi^2 n_0^2}{3M_{NP}^2 \lambda_0^2} \langle R_g^2 \rangle \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) + \frac{1}{M_{NP}} \quad \dots \text{Equation 2}$$

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad \dots \text{Equation 3}$$

ここで、K は光学定数であり、Equation 3 により与えられる。 θ は散乱角を示し、 $R(\theta)$ は散乱角に対する過剰レイリー比である。 c は RI 検出器から算出した PLA-PEG の重量濃度を示し、 n_0 は移動相の屈折率 (1.331) である。 λ_0 は多角散乱検出器のレーザーの波長であり、658 nm とした。 M_{NP} は NP の重量平均分子量である。 N_A はアボガドロ数 (6.03×10^{23}) である。 dn/dc は示唆屈折率の濃度増分であり、0.108 mL/g とした。(122)

N_{ass} は以下の式より算出した。

$$N_{ass} = M_{NP} / M_{n \text{ PLA-PEG}_{uni}} \quad \dots \text{Equation 4}$$

$M_{n \text{ PLA-PEG}}$ は NMR から算出した PLA-PEG の平均分子量を示す。

R_g/R_h 比は形状比と呼ばれ、NP の構造を推定する値である。(43, 123) R_h は D_h の半値として算出した。

Exp.1.5.4 TAM 濃度測定

TAM 濃度は高速液体クロマトグラフィー-紫外分光検出法 (HPLC-UV) により算出した。測定条件を下記に示す。調製した NP を 0.1 mL 秤取り、MeCN を加えて 1 mL とした。定量用の標準溶液として、TAM を MeCN で 1 mg/mL としたストック溶液を希釈し、0.5~100 μ g/mL の希釈系列を調製し、HPLC で測定した。

Table 14 Analytical method of HPLC-UV

項 目	設定
System	Shimazu Prominence
UV detector	240 nm
Column	Waters Xbridge 2.5 μ m, 4.6 \times 50 mm
Column oven temperature	50 $^{\circ}$ C
Mobile Phase	20 mM phosphate buffer pH3.0 / MeCN = 1 / 1
Gradient	Isocratic flow
Flow rate	1.0 mL/min.
Injection volume	20 μ L
Sample temperature	25 $^{\circ}$ C
Needle wash solvent	MeCN

Exp.1.5.5 PLA-PEG 濃度測定

PLA-PEG の濃度は、SEC-RI により測定した。測定条件は、Table 12 に記載の条件にて測定した。調製した NP を 0.1 mL 秤取し、DMF を 0.2 mL 加えて混合した。濃度測定のため、各種 PLA-PEG を DMF で溶解し、10 mg/mL のストック溶液とした。ストック溶液を DMF で希釈し、0.5~8 mg/mL の希釈系列を調製し、HPLC で測定した

Exp.1.5.6 封入率 (EE %) と薬物搭載量 (DLC_{conv.}) の算出

NP の調製工程における TAM の回収率と薬物搭載量は以下の式により算出した。

$$EE(\%) = \frac{C_{TAM\ loaded} \times V_{rec}}{C_{TAM\ fed} \times V_{fed}} \times 100 \quad \dots \text{Equation 5}$$

$$DLC_{conv}(wt\%) = \frac{C_{TAM\ loaded}}{C_{PLA-PEG}} \times 100 \quad \dots \text{Equation 6}$$

ここで、 $C_{TAM\ loaded}$ は透析後の NP 中の TAM 濃度であり、 V_{rec} は透析により回収された NP 溶液の容量である。 $C_{TAM\ fed}$ は透析前の NP 中の TAM 濃度であり、 V_{fed} は透析に供した NP 溶液の容量である。 $C_{PLA-PEG}$ は透析後の NP の PLA-PEG の重量濃度である。

Exp.1.5.7 固相抽出法による薬物搭載量 (DLC_{SPE}) の測定

固相抽出によって、TAM の濃度を算出した。固相抽出カラム (Inertsep HLB, GL science, Japan) を MeCN 1 mL で活性化した後に、蒸留水 2 mL で平衡化した。0.1 mL の調製した NP 溶液を滴下した後に、20%MeCN 2 mL で吸着した NP を洗浄した。MeCN 1 mL で TAM を溶出した。定量用の TAM として、DMF で溶解し、1 mg/mL としたストック溶液を Blank PLA-PEG NP 溶液で希釈し、5~100 μ g/mL の希釈系列を作成した。作成した標準溶液を同様に固相抽出で抽出、作製した。TAM 濃度は、2.3.4.4 に記載の方法で測定した。DLC_{SPE} は次式で算出した。

$$DLC_{SPE}(wt\%) = \frac{C_{TAM\ SPE}}{C_{PLA-PEG}} \times 100 \quad \dots \text{Equation 7}$$

ここで、 $C_{TAM\ SPE}$ は固相抽出で定量した TAM の濃度である。

$$\text{Surface adsorbed TAM}(\%) = 100 - \frac{DLC_{SPE}}{DLC_{Conv.}} \times 100 \quad \dots \text{Equation 8}$$

表面吸着した TAM の割合を上記式より算出した。

Exp.1.5.8 表面 PEG 含量、表面 PEG 密度の測定

表面 PEG 含量、表面 PEG 密度は、 $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, ADVANCE III 400 MHz, US) により評価した。Sephadex G25 column (Cytiva, PD-10 miditrap, US) を用いて調製した NP の媒体を重水に置換した。50 ppm の MeCN を内部標準として加えた。PEG 含量を定量するために、mPEG 5 kDa を 0.1~1.0 mM の希釈系列で調製し、同様の方法で調製した。総濃度については、重水で置換したサンプルを凍結乾燥し、50 ppm の MeCN を含む重水素化クロロホルムで再溶解することで算出した。調製したサンプルを $^1\text{H-NMR}$ で測定し、内標準である MeCN のケミカルシフトの積分値で正規化した値を用いて、mPEG 5 kDa 標準溶液から作成した検量線で濃度を決定した。表面 PEG 含量と表面 PEG 密度について、次式より算出した。

$$\text{Surface PEG contents}(\%) = \frac{C_{molePEG\ exposed}}{C_{molePLA-PEG}} \times 100 \quad \dots \text{Equation 9}$$

$$\Gamma = \frac{N_{ass} \times \text{Surface PEG contents}(\%)}{4\pi(R_h)^2} \times 100 \quad \dots \text{Equation 10}$$

ここで、 $C_{molePEG\ exposed}$ は重水中で $^1\text{H-NMR}$ より算出したモル PEG 濃度であり、 $C_{molePLA-PEG}$ は重水素化クロロホルム中で $^1\text{H-NMR}$ より算出した総モル PLA-PEG 濃度である。 Γ は NP 表面の PEG 分子の 100 nm^2 あたりの個数であり、表面 PEG 密度である。

Exp.1.5.9 NP からの TAM の放出性評価

NP からの TAM の放出性は透析膜法にて評価した。調製した NP 溶液を TAM 濃度が 0.2 mg/mL となるように蒸留水で希釈した。希釈した溶液 0.5 mL を分画分子量 100 kDa の透析膜 (Repligen, SpectraPor Dialysis, US) に入れ密封した。密封した透析バックを 12 mL の 50 mM リン酸緩衝液 pH7.4/ 0.5% ポリソルベート 80 もしくは、50 mM 酢酸緩衝液 pH5.5/ 0.5% ポリソルベート 80 に浸漬した。ポリソルベート 80 は、シンク条件とするために添加した。調製したチューブを 37°C 、 200 min^{-1} にて水浴で振とうした。振とう開始後、0.5, 1, 2, 4, 7, 24 時間後に外水相を 0.5 mL サンプルングし、新たに緩衝液を 0.5 mL 添加した。サンプルリングした外水相を紫外／可視分光光度計 (Hitachi high-tech U-3900, Japan) で 280 nm における吸光度を測定した。TAM の定量のために、各種バッファーで可溶化した TAM を標準溶液として 1~10 $\mu\text{g/mL}$ の希釈系列を作製し、同様に測定した。総 TAM 濃度は、透析膜に封入する前の溶液を MeCN で崩壊させて、同様に測定した。放出率を次式より算出した。

$$\text{Released TAM}(\%) = \frac{C_{release} \times V_{out}}{C_{intact} \times V_{in}} \times 100 \quad \dots \text{Equation 11}$$

ここで、 $C_{release}$ は、サンプルリングした外水相中の TAM 濃度であり、 C_{intact} は総 TAM 濃度である。 V_{out} は外水相の体積であり、 V_{in} は内水相の体積である。

Exp.1.5.10 凍結乾燥 NP の結晶性評価

TAM を封入した DL-PEG NP (12k-5k)、L-PEG NP (12k-5k)、SC-PEG NP (12-5k) 0.1 mL をスクリーバイアルに充てんし、凍結乾燥機で凍結乾燥した。生成した粉体を XRD で測定した。測定方法は Exp.1.3.2 に準じた。

Exp.1.5.11 Blank PLA-PEG NP の臨界会合濃度 (CAC) 測定

Blank PLA-PEG NP を 400 $\mu\text{g/mL}$ から公比 2 において、10 段階に希釈した。希釈した溶液 0.2 mL を黒色 96 well plate に添加し、40 mM 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene メタノール溶液を 2 μL 添加後、遮光し、10 分インキュベーションした。蛍光プレートリーダー (DS Pharma Biomedical, Powerscan HT, Japan) にて、励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm として測定した。得られた蛍光強度を対数濃度に対してプロットし、低濃度側、高濃度側の片対数直線の交点を CAC とした。

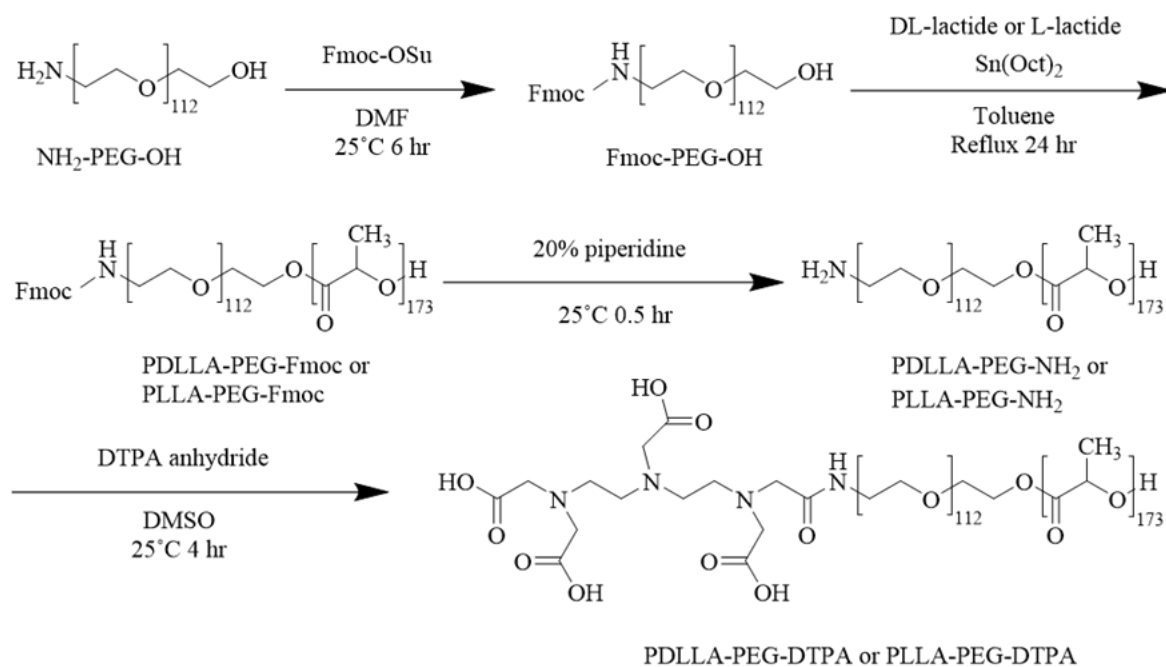
Exp.1.6. 実験動物

ddY 系雄性マウス (6 週齢) は清水実験材料株式会社から購入した。以後すべての動物実験はすべて京都薬科大学動物実験実施規程に則った。

Exp.1.7. 放射標識用 DTPA 結合型 PLA-PEG (PDLLA-PEG-DTPA ならびに PLLA-PEG-DTPA) の合成

Figure 38 に PDLLA-PEG-DTPA ならびに PLLA-PEG-DTPA の合成スキームを示す。NH₂-PEG-OH 100 mg を秤取し、Fmoc-OSu 0.1 mg を含有する DMF 溶液を加え、室温で 6 時間攪拌、反応させた。反応物は、ジエチルエーテルで精製し、乾燥固化させた。合成した Fmoc-PEG-OH 80 mg をナスフラスコに入れ、DL-lactide または、L-lactide を 200 mg 加えた。Sn (Oct)₂ 0.01 mg を含有するトルエン溶液を 10 mL 加えて、140 °C で 24 時間還流した。室温にまで冷却し、20% ピペリジンを加え、室温で 30 分反応させた。反応後の溶液をジエチルエーテルで精製し、乾燥固化させた。(PDLLA-PEG-NH₂ ならびに PLLA-PEG- NH₂) PDLLA-PEG-NH₂ ならびに PLLA-PEG- NH₂ 200 mg を秤取し、DMSO 2 mL に溶解させた。DTPA 無水物 11.4 mg を添加し、25 °C で 4 時間反応させた。反応後に蒸留水を 18 mL 加えた後に、透析を行い、DMSO と未反応の DTPA 無水物を除去した。透析完了後、凍結乾燥により、固化した。(PDLLA-PEG-DTPA ならびに PLLA-PEG-DTPA)

Figure 38 Synthesis of PLA-PEG-DTPA



(Ogawa et. al., *Int. J. Pharm.*, 2021, 608, 121120, Synthetic Scheme S1)

Exp.1.8. PLA-PEG-DTPA-¹¹¹In/¹⁴C-TAM 標識 PLA-PEG NP の調製

PDLLA-PEG-DTPA または PLLA-PEG-DTPA 2 mg を 0.02 mL の DMF に溶解し、0.18 mL の蒸留水を 1000 min⁻¹ で攪拌しながら滴下した。0.2 mL の ¹¹¹InCl₃ と 0.02 mL の 100 mM クエン酸バッファー (pH 5.5) を加えて、25 °C で 30 分間インキュベートした。¹¹¹In で標識した PLA-PEG-DTPA NP を PD-10 カラムと蒸留水を使用して精製し、その後、エバポレートして固化した。得られた PDLLA-PEG-DTPA-¹¹¹In (¹¹¹In-PDLLA-PEG) および DLLA-PEG-DTPA-¹¹¹In (¹¹¹In-DLLA-PEG) を DMF で溶解した。調製した溶液の放射活性をガンマカウンターにて測定した。(Perkin-Elmer, 1480 Wizard 3", US)

PLA-PEG 30 mg を DMF 0.15 mL に溶解し、10 μL ¹¹¹In-PDLLA-PEG または ¹¹¹In-DLLA-PEG を添加した。TAM 14 mg を THF 0.15 mL に溶解し、10 μL の ¹⁴C-TAM を添加した調製した 2 つの有機相を等量混合し 50 °C に加熱した。蒸留水 2.7 mL を 1000 min⁻¹ で攪拌し、有機相を 60 mL/min で滴下し、調製した液を透析した。透析後、9%スクロースを加えて等張化した。調製した NP は投与まで 2-8 °C で保存した。

Exp.1.9. 放射標識した PLA-PEG NP の体内動態評価

放射標識した PLA-PEG NP を 6 週齢の ddY マウスに尾静注により投与した。(80 mg PLA-PEG / kg、370 kBq ¹¹¹In / kg、4 mg TAM / kg、320 kBq ¹⁴C / kg) TAM 単体投与した対照群として、1%ポリソルベート 80 で可溶化した投与液を尾静注により投与した。投与後 0.083, 1, 3, 6, 24 時間において血液を下大静脈から採血した、同時に、膀胱を採取した。採取した血液を 2,000 g 5 分間遠心分離し、血漿を得た。肝臓と脾臓を同時に採取し、生理食塩水で洗浄

し、重量を測定した。

採取した肝臓、脾臓、膀胱ならびに 100 μ L の血漿を測定用チューブに入れ、 ^{111}In の放射活性をガンマカウンターで測定した。(Perkin-Elmer, 1480 Wizard 3", US) ^{14}C 放射性活性を測定するため、100 μ L の血漿ならびに肝臓、脾臓をそれぞれ 最大 30 mg 程度に切除し、シンチレーションバイアルに秤取した。臓器片を溶解させるために 0.3mL の Soluene 350 を加え、50 $^{\circ}\text{C}$ で密栓下 8 時間以上浸漬した。その後、100 μ L の 30%過酸化水素を加えて 50 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間反応させ脱色した。脱色した検体を 50 μ L の 35% 塩酸で中和した。5 mL の Clear-Sol I を各バイアルに添加し、 ^{14}C の放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-6100, Japan) を使用して測定した。

得られた放射活性を血漿体積 (mL) ならびに臓器重量 (g) で正規化し、投与後の時間に対してプロットした。PLA-PEG-DTPA- ^{111}In ならびに ^{14}C -TAM の血漿中正規化濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) は台形法にて算出した。両放射標識体の全身クリアランス、半減期 ($T_{1/2}$)、分布容積、を推定するために血漿中正規化濃度-時間プロファイルを非線形最小二乗プログラム MULTI (124) を使用して解析した。

Exp.1.10. 統計的解析

統計的有意性は、Student t 検定によって解析した。有意水準は $p<0.05$ とした。

第 2 章 実験の部

Exp.2 試薬、動物、実験方法

Exp.2.1. 試薬

試薬については、第 1 章 (Exp.1.1) に準じた。その他の試薬については、市販の特級試薬を用いた。

Exp.2.2. PLA-PEG の合成

合成方法は第 1 章 (Exp.1.2) に準じた。第 2 章では、L-PEG 12k-5k ならびに D-PEG 12k-5k を合成して評価に使用した。

Exp.2.3. PLA-PEG の特性解析

Exp.2.3.1 PLA-PEG の M_n と PdI_{uni} の算出

M_n 並びに PdI_{uni} の算出は第 1 章 (Exp.1.3.1) に準じた。

Exp.2.3.2 L-PEG ならびに D-PEG の示差走査熱分析 (DSC)

L-PEG ならびに D-PEG 1mg をアルミニウム製パン (TA instruments, Hermetic Pan, US) に秤取し圧着した。調製したサンプルを DSC (TA instruments, Q2000, US) にて以下の温度プログラムで分析した。

昇温時：平衡化：10 °C 2min、昇温速度：+2 °C/min、スキャン温度：10-160 °C

降温時：平衡化：160 °C 2min、昇温速度：-2 °C/min、スキャン温度：160-10 °C

低温側に現れる吸熱ピークを PEG ドメインの融解温度 (T_m)、発熱ピークを PEG ドメインの結晶化温度 (T_c) として同定した。高温側に現れる吸熱ピークを PLA ドメインの T_m 、発熱ピークを PEG ドメインの T_c として同定した。

Exp.2.3.3 Stereocomplex 形成 PLA-PEG unimer (SC-PEG) の良溶媒中でのコンフォメーション評価

SC-PEG のコンフォメーション変化については、SEC-RI により評価した。移動相について、0-300 mM の LiBr を含む DMF を用いることならびに、カラム温度を 65 °C とした点以外は、第 1 章 (Exp.1.3.1) に準じた。ピークトップの相対分子量を $Rel M_p$ として算出した。

Exp.2.4. SC-PEG NP の調製

L-PEG 50 mg、D-PEG 50 mg ならびに TAM 10 mg を秤取し、0-300 mM の LiBr を含有する DMF 1 mL にそれぞれ溶解した。(良溶媒溶液) 溶解時には、35 °C または、65 °C に加温した。良溶媒溶液 1 mL と蒸留水 9 mL を T-junction mixer (YMC, ID Φ 0.5 mm, Japan) で混合した。混合時の総流速は 1-8 mL/min とした。また、混合時の温度は 35 °C または、65 °C とした。以降の精製、ろ過、保管工程については、第 1 章に準じた。(Exp.1.4)

Exp.2.5. TAM を封入した SC-PEG NP の特性解析

Exp.2.5.1 D_h と PdI_{NP} の算出

D_h と PdI_{NP} の算出は第 1 章 (Exp.1.5.1) に準じた。

Exp.2.5.2 封入率 と $DLC_{conv.}$, DLC_{SPE} の算出

封入率と $DLC_{conv.}/DLC_{SPE}$ の算出は第 1 章に準じた。(Exp.1.5.6, Exp.1.5.7) 算出に必要な TAM の濃度測定 (Exp.1.5.4)、SC-PEG の濃度測定 (Exp.1.5.5) についても第 1 章に準じた。

Exp.2.5.3 平均会合数 (N_{ass})と回転半径 (R_g)、表面 PEG 密度含量と表面 PEG 密度の算出

N_{ass} と R_g の算出は第 1 章 (Exp.1.5.3) に準じた。表面 PEG 密度含量と表面 PEG 密度の算出は第 1 章 (Exp.1.5.8) に準じた。

Exp.2.5.4凍結乾燥 SC-PEG NP の形態観察

凍結乾燥した SC-PEG NP の形態観察は、Field-emmission scanning electron microscopy (FE-SEM, JEOL, JSM-IT500HR LV, Japan) を用いて行った。凍結乾燥した SC-PEG NP をオスミウムコーター (Meiwafosis, Neoc, Japan) を使用して表面をオスミウムでスパッタリングした。前処理したサンプルを加速電圧 10 kV、観察倍率 100,000 倍にて観察を行った。

Exp.2.6. PEG 表面密度と粒子径の異なる放射標識 SC-PEG NP (PEG Sparse- D_h Small NP; $NP_{Sparse-Small}$ ならびに PEG Dense- D_h Large NP; $NP_{Dense-Large}$) の作製

^{111}In -PLLA-PEG の標識方法は第 1 章 (Exp.1.8) に準じた。 ^{14}C -TAM と ^{111}In -PLLA-PEG を DMF に溶解し、調製した溶液の放射活性をガンマカウンターにて測定した。(Perkin-Elmer, 1480 Wizard 3", US)。

PLLA-PEG と PDLA-PEG をそれぞれ 50 mg 秤取し、20 mM LiBr DMF ($NP_{Sparse-Small}$) または、100 mM LiBr DMF ($NP_{Dense-Large}$) 0.15 mL にそれぞれ溶解させた。 ^{111}In -PLLA-PEG 200 kBq/10 μL を加えた。TAM 10 mg を 20 mM LiBr DMF ($NP_{Sparse-Small}$) または、100 mM LiBr DMF ($NP_{Dense-Large}$) 0.15 mL にそれぞれ溶解させた。同様に ^{14}C -TAM 200 kBq/10 μL を加えた。PLA-PEG 溶液と TAM 溶液を等量混合し、良溶媒溶液とした。SC-PEG NP の調製は Exp.2.4 に準じた。 $NP_{Sparse-Small}$ の調製においては、TFR を 8 mL/min とし、 $NP_{Dense-Large}$ の調製においては、TFR を 3 mL/min とした。

Exp.2.7. 異なる製剤特性を持つ SC-PEG の PK プロファイル、体内動態解析

$NP_{Sparse-Small}$ と $NP_{Dense-Large}$ の放射化学的投与量は、(370 kBq ^{111}In -SC-PEG NPs /kg, 320 kBq ^{14}C -TAM /kg) とし、6 週齢の ddY マウスに投与した。投与後 0.083, 0.5, 1, 3, 6, 24 時間において、マウスを屠殺し、血漿、肝臓、脾臓を回収した。放射活性の測定方法、解析方法は、第 1 章に準じた。(Exp.1.9) 血漿中正規化濃度プロファイルの解析は 2-compartment モデルを採用した。

Exp.2.8. 統計解析

統計的有意性は、Student t 検定によって解析した。有意水準は $p<0.05$ とした。 D_h と PdI_{NP} について、TFR と LiBr 濃度に対する応答曲面の解析、多重比較においては、Design-Expert software (Stat-Ease, US) により、two-way ANOVA を適応し、有意水準は $p<0.05$ とした。

第 3 章 実験の部

Exp.3 試薬、動物、実験方法

Exp.3.1. 試薬

第 1 章と共通する試薬については、第 1 章に準じた。

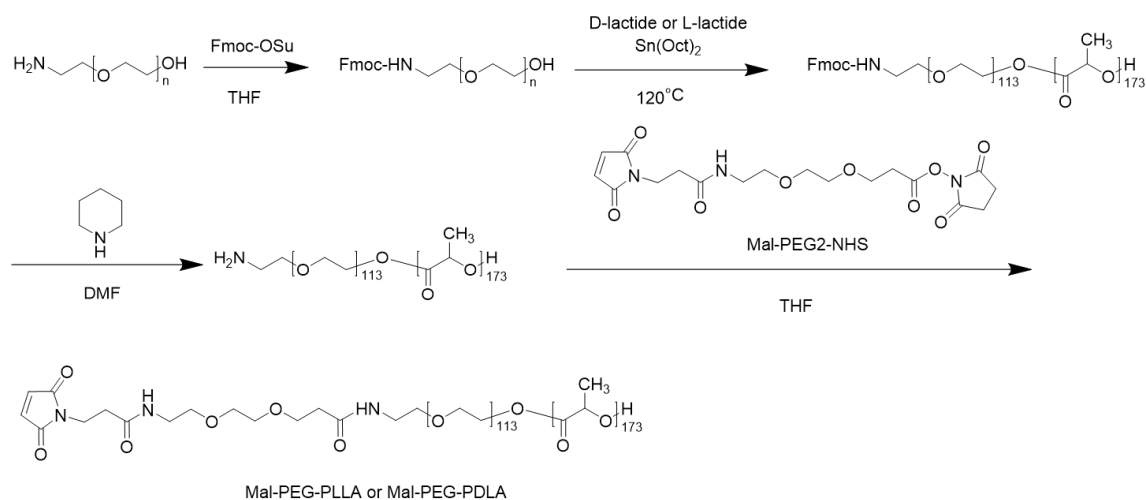
Maleimide-PEG2-NHS ester、D-乳酸、L-乳酸は 東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。マウス血清、塩化ナトリウム (NaCl)、ハイドロキシアパタイト (HAP) は富士フイルム和光純薬株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。トリフルオロ酢酸 (TFA, HPLC grade) は関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA, 0.5M, pH8.0)、Pierce BCA protein assay kit、NuPAGE LDS sample buffer 4x (LDS sample buffer)、NuPAGE MES SDS running buffer (running buffer)、SYPRO Ruby protein gel stain、NuPAGE 4 12%ならびに Bis-Tris, 1.0 mm, mini protein gel は Thermo Fisher Scientific (MA, US) より購入した。1-Thioglycerol は ナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) より購入した。1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, US) より購入した。骨標的指向性ペプチドの双性イオン誘導体 (Zwi. pep., D8K8C) とアニオン誘導体 (Ani. pep., and D8G8C) は Smart Bioscience (Saint Egrève, France) にて合成した。2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) は同仁化学株式会社 (Kyoto, Japan) より購入した。

Exp.3.2. PDLA-PEG-Maleimide (PDLA-PEG-Mal)/ PLLA-PEG-Maleimide (PLLA-PEG-Mal) ならびに PDLA/ PLLA ホモポリマーの合成

Figure 39 に PDLA-PEG-Mal と PLLA-PEG-Mal の合成スキームを示す。HO-PEG-NH₂ 500 mg と Fmoc-OSu 67.5 mg をスクリュバイアルに秤取し、THF 4 mL を加えて 2 時間反応させた。反応物をエーテルで精製し、HO-PEG-Fmoc を得た。精製した HO-PEG-Fmoc 200 mg をマイクロウェーブ反応用のガラスチューブに秤取し、110 °C にて減圧し、残留する水分を取り除いた。同ガラスチューブに D-lactide または L-lactide 500 mg を秤取し、Sn (Oct)₂ 1 mg を反応触媒として加えた。ガラスチューブを窒素環境下で、密閉し、120 °C で 2 時間反応させた。反応物を DCM で溶解し、ジエチルエーテルで精製した。精製した PDLA-PEG-Fmoc または、PLLA-PEG-Fmoc を 20% piperidine/DMF を用いて脱保護した。同様にジエチルエーテルで精製し、PDLA-PEG-NH₂ または、PLLA-PEG-NH₂ を得た。Maleimide-PEG2-NHS ester 34 mg と PDLA-PEG-NH₂ または PLLA-PEG-NH₂ 500 mg を秤取し、THF 5 mL で溶解し、2 時間反応させた。同様にジエチルエーテルで精製し、PDLA-PEG-Mal または PLLA-PEG-Mal を得た。

PDLA/ PLLA ホモポリマーは開始剤を D-乳酸または、L-乳酸とし、開環重合法により合成した。D-乳酸 または L-乳酸 10 mg と D-lactide または L-lactide 1380 mg をガラスチューブに秤取し、Sn (Oct)₂ 10 mg を触媒として加えた。同様に、窒素環境下で密閉し、120 °C で 2 時間反応させ、ジエチルエーテルで精製した。

Figure 39 Synthesis of PLA-PEG-Maleimide



(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Scheme S1)

Exp.3.3. PLA ホモポリマーを含有／非含有 PLA-PEG NP の作製

PDLA-PEG-Mal ならびに PLLA-PEG-Mal を 7.5 mg ずつ秤取した。TAM 1.0 mg を秤取し、THF 0.6 mL で溶解させた。(良溶媒溶液) 良溶媒溶液を 60 mL/min の速度で、 $1,200 \text{ min}^{-1}$ の速度で攪拌した 10 mM HEPES-NaOH/ 1mM EDTA pH7.5 (prep. buffer) 2.4 mL に滴下した。作製した PLA ホモポリマーを含有しない PLA-PEG-Mal NP ($\text{NP}_{\text{PLA-PEG}}$), 2.5 mL を Sephadex G-25 column (Cytiva, PD-10 miditrap, US) を使い精製した。PLA ホモポリマーを含有する PLA-PEG NP ($\text{NP}_{\text{PLA/PLA-PEG}}$)では、良溶媒の調製として、PDLA-PEG-Mal ならびに PLLA-PEG-Mal を 4.5 mg ずつ秤取し、PDLA ならびに PLLA を 3.0 mg ずつを秤取した点以外は、 $\text{NP}_{\text{PLA-PEG}}$ と同様に調整した。

Exp.3.4. NP 表面へのペプチドの修飾と製剤化／保管安定性試験

2.5 mg/mL の $\text{NP}_{\text{PLA/PLA-PEG}}$ (0.83 mM maleimide 残基に相当) ならびに 1.2, 0.58, 0.35, 0.23, 0.12, 0.083 mM の Ani. pep.または、Zwi. pep を反応緩衝液 (150 mM NaCl を含有する prep. buffer) 中で混合し、室温で 1 時間攪拌した。反応液の一部を修飾量の決定に使用した。反応後の液に 1.77 mM 1-thioglycerol をクエンチャーとして添加し、未反応のマレイミド残基をクエンチした。クエンチ後の溶液を透析し、未反応のペプチドとクエンチャーを取り除いた。透析後の NP は、 $0.45 \mu\text{m}$ の PVDF フィルター (Merck, Germany) でろ過し、使用するまで $2-8^\circ\text{C}$ で保管した。同時に保管安定性評価用に、検体をガラスバイアルに充てんし、 $2-8^\circ\text{C}$ で 1 か月保管後評価した。

Exp.3.5. ペプチドの修飾量 (MC) の定量

ペプチドの MC の算出は、反応液の一部を超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) -UV で分析し、未反応のペプチドを検出、定量した。UPLC-UV の測定条件は Table 15 に記載の条

件とした。ペプチド標準液の測定範囲は、5~100 µg/mL とした。MC は以下の式より算出した。

$$MC \text{ (mole\% residue)} = (C_{p \text{ feed}} - C_{p \text{ react}}) / C_{\text{PEG-Mal}} \times 100 \quad \cdot \cdot \cdot \text{Equation 12}$$

ここで、 $C_{p \text{ react}}$ は、反応後の液中のペプチドモル濃度であり、 $C_{p \text{ feed}}$ は、反応に供したペプチドのモル濃度である。 $C_{\text{PEG-Mal}}$ は PLA-PEG-Mal の総モル濃度である。

Table 15 Analytical method of peptide quantified by UPLC-UV

項 目	設定
System	Waters Acuity H-class Bio
UVdetector	215 nm
Column	Waters ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column, 300 Å, 1.7 µm, 2.1 × 50 mm
Column oven temperature	40 °C
Mobile Phase A	0.1% TFA/MeCN= 97/3
Mobile Phase B	MeCN
Gradient	0 to 1 min: B 0%, 1 to 2.5 min: B 0→50%, 2.51 to 5 min: B 100%
Flow rate	0.35 mL/min.
Injection volume	5 µL
Sample temperature	25°C
Needle wash solvent	50% MeCN

Exp.3.6. 調製した NP の特性解析

Exp.3.6.1 D_h と PdI_{NP} の評価

希釈媒体を Prep. buffer とした以外は、Exp.1.5.1 に準じた。

Exp.3.6.2 ゼータ電位 の評価

希釈媒体を Prep. buffer とし、総ポリマー濃度を 1 mg/mL とした以外は、Exp.1.5.2 に準じた。

Exp.3.6.3 TAM 濃度、総ポリマー濃度の算出と DLC の算出

TAM 濃度の算出は、サンプルの調製方法と標準液の測定範囲は Exp.1.5.4 に準じた。
UPLC の測定条件は Table 16 に示した。

Table 16 Analytical method of TAM concentration quantified by UPLC-UV

項 目	設定
System	Waters Acuity H-class
UVdetector	240 nm
Column	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 × 50 mm
Column oven temperature	40 °C
Mobile Phase A	0.1% TFA/MeCN=40/60
Gradient	Isocratic
Flow rate	0.35 mL/min.
Injection volume	2 µL
Sample temperature	25 °C
Needle wash solvent	50% MeCN

総ポリマー濃度は示唆屈折率 (RI) により決定した。示唆屈折率計 (Anton Paar, Abbemat MW, Austria) の測定波長は、658 nm、温度は、25 °C とした。標準溶液は、PDLA-PEG-Mal ならびに PLLA-PEG-Mal を 1.5 mg ずつ秤取 (NP_{PLA-PEG})、または PDLA-PEG-Mal ならびに PLLA-PEG-Mal 0.9 mg ずつ、ならびに PDLA ならびに PLLA homopolymer を 0.6 mg ずつ秤取 (NP_{PLA/PLA-PEG}) し、THF で溶解後、乾燥固化させた。Prep. buffer を 0.5 mL 添加し、70 °C で超音波照射下で均一に分散させた。調製した標準溶液を精密にメスフラスコに秤取り、最終濃度を 5 mg/mL とした。NP_{PLA/PLA-PEG} の屈折率の濃度増分 (dn/dc) は 0.126 mL/g、NP_{PLA-PEG} の dn/dc は 0.109 mL/g であった. (Figure 40A)

総ポリマー濃度の定量について、RI 測定の定量下限を下回る検体は蛍光分光法を使用して定量した。1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は臨界会合濃度 (CAC) の算出に使用される蛍光色素であり、疎水的な環境において量子収率が向上し、CAC 以上では蛍光量と NP の濃度に直線的な関係性を示す。(125) 総ポリマー濃度に関して、SC-PEG NP の CAC を越える濃度において、定量を実施した。サンプル 200 µL を 96 well plate に添加し、0.4 mM DPH メタノール溶液 2 µL を添加し、マイクロプレートリーダー (Thermofisher Scientific, Varioscan Lux, US) にて、励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm として、測定を行った。NP_{PLA-PEG} と NP_{PLA/PLA-PEG} について、標準溶液の濃度を 50~400 µg/mL とし、測定マトリックスを希釈媒体として、直線性を確認した。(Figure 40B)

DLC について、以下の式に従って算出した。

$$DLC \text{ (wt\%)} = C_{TAM \text{ loaded}} / C_{Polymer} \times 100$$

• • • Equation 13

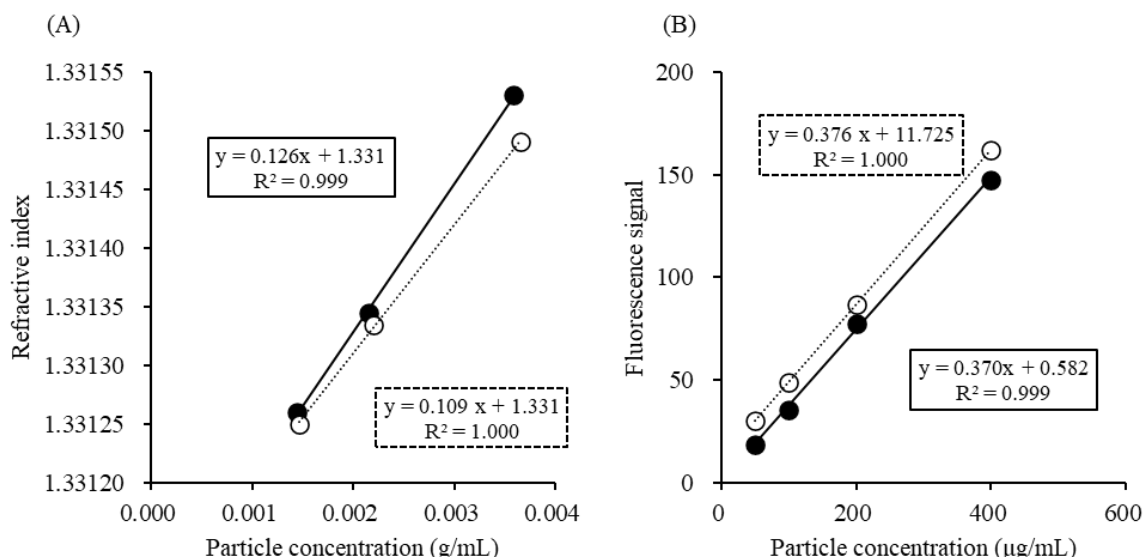


Figure 40 Quantification of NP concentration.

Figure 40A shows the refractive index as a function of standard particle concentration. The slope of the fitted curve is defined as dn/dc . Figure 40B shows the fluorescence signal of DPH as a function of particle concentration. The matrix of the standard solutions was an ultracentrifuged serum medium. Closed circles indicate PLA-PEG NP with PLA homopolymers ($NP_{PLA/PLA-PEG}$). Open circles indicate PLA-PEG NP without PLA homopolymers ($NP_{PLA-PEG}$).

Quantification of NP concentration

(Ogawa et. al., *J. Pharm. Sci.*, 2022, 111, 2888-2897, Figure S1)

Exp.3.6.4 NP の構造パラメータの算出

NP の構造パラメータの算出について、SEC-MALS 測定と 1H -NMR の測定条件は、Exp.1.5.3 ならびに Exp.1.5.8 に準じた。PLA-PEG-Mal の会合数については、以下の式に従い、算出した。

$$N_{PEG-Mal} = n M_{NP} / (n M_{PLAPEG-Mal} + (1 - n) M_{PLA}) \quad \dots \text{Equation 14}$$

ここで、 n は PLA-PEG-Mal の NP 中のモル分率であり、 $NP_{PLA-PEG}$ においては、 $n=1$ であり、 $NP_{PLA/PLA-PEG}$ においては、 $n=0.5$ である。 M_{NP} は、NP の見かけの分子量である。 $M_{PLAPEG-Mal}$ は PDLA-PEG-Mal と PLLA-PEG-Mal の平均分子量であり、 $M_{PLAPEG-Mal}$ は PDLA ホモポリマーと PLLA ホモポリマーの平均分子量である。

NP の構造パラメータの算出については、以下の式から解析した。(88)

$$Sur. Cont. PEG-Mal = C_{PEG exp.} / n C_{polymer} \times 100 \quad \dots \text{Equation 15}$$

$$\Gamma_{PEG} = N_{PEG-Mal} \times Sur. Cont. PEG-Mal / 4\pi R_h^2 \times 100 \quad \dots \text{Equation 16}$$

$$\Gamma_{pep} = \Gamma_{PEG} \times MC \quad \dots \text{Equation 17}$$

$$R_{f PEG} = 0.350 m^{3/5} \quad \dots \text{Equation 18}$$

$$R_{f pep} = 0.365 p^{3/5} \quad \dots \text{Equation 19}$$

$$D_{PEG} = 2\sqrt{1/\pi \Gamma_{PEG}} \quad \dots \text{Equation 20}$$

$$D_{\text{pep}} = 2 \sqrt{1/\pi \Gamma_{\text{pep}}}$$

• • • Equation 21

ここで、Sur.Cont.PEG-Mal と $C_{\text{PEG exp.}}$ はそれぞれ $^1\text{H-NMR}$ から算出した PEG の表面含量と表面に露出する PEG のモル濃度である。 R_h は、DLS より算出した流体半径である。 Γ_{PEG} は 100 nm^2 あたりの表面 PEG 密度であり、 Γ_{pep} は 100 nm^2 あたりの表面ペプチド密度である。 R_{fPEG} ならびに R_{fpep} はそれぞれ PEG とペプチドの Flory 半径である。 0.350 (nm) はエチレンオキサイド 1 ユニットの長さである。 $(126) 0.365 \text{ (nm)}$ はアミノ酸 1 残基の長さである。 $(127) m$ と f はそれぞれ PEG とペプチドの重合数であり、 $m=113, p=17$ である。 D_{PEG} と D_{pep} はそれぞれ隣り合う PEG 鎖、ペプチド同士の距離である。

Exp.3.7. NP の血清耐性評価

Exp.3.7.1 プロテインコロナの形成と分離

調製した NP の総ポリマー濃度を 2 mg/mL に調製し、 1 mL を 10% マウス血清と混合し、 37°C で 1 時間 インキュベートした。プロテインコロナの分離は、スクロースクッション法を用いた。インキュベーションした溶液 1 mL を超遠心用チューブ (Beckman coulter, Polycarbonate open tube, US) に添加した。その後、 0.7 M スクロース溶液 0.2 mL を超遠心用チューブの底部にシリンジを使って添加した。チューブを 5°C , $100,000 \text{ g}$ で 45 分遠心した。遠心後の上清を廃棄し、ペレットを同一の遠心条件で超遠心し、PBS で 2 回洗浄した。洗浄後、 0.1 mL の PBS で再懸濁し、総ポリマー濃度を測定した。

Exp.3.7.2 タンパク定量とポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

タンパク質量は、ビスンコニン酸 (BCA) 法により定量した。方法は、Pierce BCA protein assay kit のプロコールに準じた。超遠心したサンプルを希釈し、 96 well plate (Thermofisher, Microwell, US) に 0.1 mL を添加した。付属する牛血清アルブミン (BSA) 標準品 (2 mg/mL) を希釈し、 $25\sim 500 \mu\text{g/mL}$ の検量線用試料を調製し、 0.1 mL を 96 well plate に添加した。BCA を含む Working solution を 0.1 mL 添加し、 37°C で 45 分インキュベートした。マイクロプレートリーダーで 562 nm の吸光度を測定し、標準品に対するタンパク質濃度を決定した。

SDS-PAGE は、次の手順で実施した。総ポリマー濃度を 1 mg/mL に調製したサンプル溶液を $13 \mu\text{L}$ 、 2% SDS/ 4% Triton-X $2 \mu\text{L}$ 、LDS sample buffer $5 \mu\text{L}$ を混合した。 90°C で 5 分インキュベーションし、タンパク質を変性させ、NP を崩壊させた。サンプルを $5,000 \text{ g}$ で 1 分遠心し、上清 $10 \mu\text{L}$ を SDS-PAGE 用ゲルにローディングした。マウス血清は $10,000$ 倍に希釈したものを対照として用いた。電気泳動は、定圧 200 V 45 分にて実施した。泳動後のゲルの染色は、SYPRO Ruby protein gel stain を使用し、染色方法は付属のプロトコールに準じた。撮像と解析は LAS3000 (Fujifilm, Japan) を使用した。

Exp.3.7.3 固相抽出 による血清中 TAM 放出量の定量

総ポリマー濃度 2 mg/mL に調製した NP 30 μ L とマウス血清 270 μ L を混合し、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。TAM の放出は、固相抽出により決定した。固相抽出 カラム (GL science, Monospin C18, Japan) を MeCN 0.1 mL で活性化した。その後、蒸留水 0.2 mL を通液し、平衡化した。インキュベートしたサンプルを 0.2 mL 添加し、その後、カラムに吸着している NP を洗浄するため、30% MeCN を 0.2 mL を通液した。最後に、MeCN 0.1 mL で溶出し、Exp.3.6.3 に記載している方法で TAM を定量した。標準溶液は、1 mg/mL に調製した TAM の 90% マウス血清溶液を希釈し、5~50 μ g/mL の濃度とした。同様の操作を行い、検量線を作製した。

Exp.3.8. ハイドロキシアパタイト (HAP) 結合評価

^{111}In を使用した NP の標識方法は、良溶媒を THF とした点、TAM を放射標識しない点以外は、Exp.1.8 に準じた。

総ポリマー量 50 μ g に相当する NP を PBS または 10% マウス血清を含む PBS に添加した。それらを 8, 32, 80 mg の HAP と混合し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間 振とうした。測定前のチューブをガンマカウンター (Perkin-Elmer, 1480 Wizard 3", US) にて測定した。5,000 g 3 分 遠心後に上清を回収し、同様にガンマカウンターで測定した。HAP への結合割合は、次に示す式で算出した。

$$\text{HAP bind (\%)} = 100 - (RA_{\text{sup.}} \times V_{\text{total}}) / (RA_{\text{total}} \times V_{\text{sup.}}) \times 100 \quad \cdots \text{Equation 22}$$

ここで、 $RA_{\text{sup.}}$ ならびに RA_{total} は、それぞれ上清と全体の放射活性であり、 $V_{\text{sup.}}$ ならびに V_{total} はそれぞれ上清と全体の液量である。

Exp.3.9. 統計解析

統計的有意差は、Student t 検定によって解析した。多重比較する場合には、Tukey's 検定によって解析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

謝辞

終わりに望み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬剤学分野 山本 昌 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、動物実験の遂行にも多大なご協力を賜り、終始御懇切なる御助言と御指導を賜りました京都薬科大学 薬剤学分野 勝見 英正 准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、本研究の実施に際して、業務外で本研究の遂行の許可を与えていただき、論文執筆の後押しをいただきました、塩野義製薬株式会社 研究本部 製剤研究所 製剤研究所長 長谷川 稔 博士、同 創剤研究領域 領域長 諸戸 康志 修士、Pharmira 株式会社 取締役 経営戦略部長 兼 技術開発部長 北村 英之 博士に心から御礼を申し上げます。

日々の実験に関して種々の貴重な御助言を賜りました、京都薬科大学 薬剤学分野 森下 将輝 助教に深謝致します。さらに、ブロック共重合体の合成方法に関して、多大な御指導と御鞭撻を賜り、実験に御協力・御助言を賜りました、塩野義製薬株式会社 海外事業本部 高田 和之 博士、固相抽出を用いた放出試験系の構築に際して多大な御協力・御指導を賜り、実験の中での活発な議論を通して、ナノパーティクルの特性解析技術の構築に共に取り組んだ、塩野義製薬株式会社 研究本部 製剤研究所 創剤技術研究 1 グループ サブグループ長 野村 大貴 修士、電子顕微鏡観察に関して、多大な御協力と御指導・御鞭撻を賜りました同 丹羽 良恵 修士、日々の業務の中で、活発な議論を通じて多くの御支援と親身な御指導を賜りました同 グループ長 一尾 俊司 修士、同 河野 秀俊 修士、同 本多 拓 修士、京都薬科大学 薬剤学分野 高木 千聖 氏に心から感謝の意を表します。

日々の研究活動の中で有益な御助言、御指導、御鞭撻を賜りました、塩野義製薬株式会社の諸先輩方、同輩の皆様は心よりお礼申し上げます。

最後に、日々の業務の傍ら、研究に専念できる環境を与えて頂き、深い理解をもって、常に支えていただいた妻、長男、長女、郷里の両親に心より感謝致します。

参考文献

- (1) 日本製薬工業協会. てきすとぶっく 製薬産業2020-2021.
- (2) Mulligan, M. J.; Lyke, K. E.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Raabe, V.; Bailey, R.; Swanson, K. A.; Li, P.; Koury, K.; Kalina, W.; Cooper, D.; Fontes-Garfias, C.; Shi, P. Y.; Türeci, Ö.; Tompkins, K. R.; Walsh, E. E.; Frenck, R.; Falsey, A. R.; Dormitzer, P. R.; Gruber, W. C.; Şahin, U.; Jansen, K. U. Phase I/II Study of COVID-19 RNA Vaccine BNT162b1 in Adults. *Nature* **2020**, 586 (7830), 589–593.
- (3) Anderson, E. J.; Rouphael, N. G.; Widge, A. T.; Jackson, L. A.; Roberts, P. C.; Makhene, M.; Chappell, J. D.; Denison, M. R.; Stevens, L. J.; Pruijssers, A. J.; McDermott, A. B.; Flach, B.; Lin, B. C.; Doria-Rose, N. A.; O'Dell, S.; Schmidt, S. D.; Corbett, K. S.; Swanson, P. A.; Padilla, M.; Neuzil, K. M.; Bennett, H.; Leav, B.; Makowski, M.; Albert, J.; Cross, K.; Edara, V. V.; Floyd, K.; Suthar, M. S.; Martinez, D. R.; Baric, R.; Buchanan, W.; Luke, C. J.; Phadke, V. K.; Rostad, C. A.; Ledgerwood, J. E.; Graham, B. S.; Beigel, J. H. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N. Engl. J. Med.* **2020**, 383 (25), 2427–2438.
- (4) Bangaru, S.; Ozorowski, G.; Turner, H. L.; Antanasijevic, A.; Huang, D.; Wang, X.; Torres, J. L.; Diedrich, J. K.; Tian, J. H.; Portnoff, A. D.; Patel, N.; Massare, M. J.; Yates, J. R.; Nemazee, D.; Paulson, J. C.; Glenn, G.; Smith, G.; Ward, A. B. Structural Analysis of Full-Length SARS-CoV-2 Spike Protein from an Advanced Vaccine Candidate. *Science*, **2020**, 370 (6520), 1089–1094.
- (5) Kikuchi, H. Future Perspective of DDS Technologies from the Viewpoint of Pharmaceutical Companies. *Drug Deliv. Syst.* **2014**, 29 (1), 51–63.
- (6) Tamura, K.; Takahashi, S.; Mukohara, T.; Tanioka, M.; Yasojima, H.; Ono, M.; Naito, Y.; Shimoi, T.; Otani, Y.; Kobayashi, K.; Kogawa, T.; Suzuki, T.; Takase, T.; Matsunaga, R.; Masuda, N. 346P Phase I Study of the Liposomal Formulation of Eribulin (E7389-LF): Results from the HER2-Negative Breast Cancer Expansion. *Ann. Oncol.* **2020**, 31, S385.
- (7) Matsumoto, T.; Komori, T.; Yoshino, Y.; Ioroi, T.; Kitahashi, T.; Kitahara, H.; Ono, K.; Higuchi, T.; Sakabe, M.; Kori, H.; Kano, M.; Hori, R.; Kato, Y.; Hagiwara, S. A Liposomal Gemcitabine, FF-10832, Improves Plasma Stability, Tumor Targeting, and Antitumor Efficacy of Gemcitabine in Pancreatic Cancer Xenograft Models. *Pharm. Res.* **2021**, 38(6), 1093–1106.
- (8) Voak, A. A.; Harris, A.; Coteron-Lopez, J. M.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer-Bazaga, S.; Croft, S. L.; Seifert, K. Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Relationships of Liposomal Amphotericin b and Miltefosine in Experimental Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, 15 (3), 1–16.
- (9) Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, 66, 2–25.
- (10) Attia, M. F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T. F. An Overview of Active and

- Passive Targeting Strategies to Improve the Nanocarriers Efficiency to Tumour Sites. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71* (8), 1185–1198.
- (11) Muhamad, N.; Plengsuriyakarn, T.; Na-Bangchang, K. Application of Active Targeting Nanoparticle Delivery System for Chemotherapeutic Drugs and Traditional/Herbal Medicines in Cancer Therapy: A Systematic Review. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 3921–3935.
 - (12) 兵頭健治; 浅野誠; 山本栄一; 菊池 寛. 担がんモデルマウスの落とし穴. *Drug Deliv. Syst.* **2017**, *32–5*, 402–410.
 - (13) Petersen, G. H.; Alzghari, S. K.; Chee, W.; Sankari, S. S.; La-Beck, N. M. Meta-Analysis of Clinical and Preclinical Studies Comparing the Anticancer Efficacy of Liposomal versus Conventional Non-Liposomal Doxorubicin. *J. Control. Release* **2016**, *232*, 255–264.
 - (14) International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Pharmaceutical Development Q8. **2010**. <https://www.pmda.go.jp/files/000156605.pdf>
 - (15) Committee for Medicinal Products for Human Use; European Medicine Agency. Joint MHLW/EMA Reflection Paper on the Development of Block Copolymer Micelle Medicinal Products. **2013**. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/draft-joint-ministry-health-labour-welfare/european-medicines-agency-reflection-paper-development-block-copolymer-micelle-medicinal-products_en.pdf
 - (16) MHLW. Guideline for the Development of Liposome Drug Products. **2016**. https://www.nihs.go.jp/drug/section4/160328_MHLW_liposome_guideline.pdf
 - (17) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry on Drug Products, Including Biological Products, That Contain Nanomaterials. **2022**. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/drug-products-including-biological-products-contain-nanomaterials-guidance-industry>
 - (18) Pillai, G., Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development. *SOJ Pharm Pharm Sci*, **2014** *1*(2), 13.
 - (19) Van Eerden, R. A. G.; Mathijssen, R. H. J.; Koolen, S. L. W. Recent Clinical Developments of Nanomediated Drug Delivery Systems of Taxanes for the Treatment of Cancer. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 8151–8166.
 - (20) Von Hoff, D. D.; Mita, M. M.; Ramanathan, R. K.; Weiss, G. J.; Mita, A. C.; Lorusso, P. M.; Burris, H. A.; Hart, L. L.; Low, S. C.; Parsons, D. M.; Zale, S. E.; Summa, J. M.; Youssoufian, H.; Sachdev, J. C. Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel-Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22* (13), 3157–3163.
 - (21) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. Block Copolymer Micelles for Drug Delivery: Design, Characterization and Biological Significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 37–48.
 - (22) Soleymani Abyaneh, H.; Vakili, M. R.; Shafaati, A.; Lavasanifar, A. Block Copolymer Stereoregularity and Its Impact on Polymeric Micellar Nanodrug Delivery. *Mol. Pharm.* **2017**,

- 14 (8), 2487–2502.
- (23) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic. *Bioeng. Transl. Med.* 2016, 1 (1), 10–29.
 - (24) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* 1986, 46 (8), 6387–6392.
 - (25) Sim, T.; Kim, J. E.; Hoang, N. H.; Kang, J. K.; Lim, C.; Kim, D. S.; Lee, E. S.; Youn, Y. S.; Choi, H. G.; Han, H. K.; Weon, K. Y.; Oh, K. T. Development of a Docetaxel Micellar Formulation Using Poly(Ethylene Glycol)–Polylactide–Poly(Ethylene Glycol) (PEG–PLA–PEG) with Successful Reconstitution for Tumor Targeted Drug Delivery. *Drug Deliv.* **2018**, 25 (1), 1371–1380.
 - (26) Sunoqrot, S.; Bugno, J.; Lantvit, D.; Burdette, J. E.; Hong, S. Prolonged Blood Circulation and Enhanced Tumor Accumulation of Folate-Targeted Dendrimer-Polymer Hybrid Nanoparticles. *J. Control. Release* **2014**, 191, 115–122.
 - (27) Sasatsu, M.; Onishi, H.; Machida, Y. Preparation and Biodisposition of Methoxypolyethylene Glycol Amine-Poly(DI-Lactic Acid) Copolymer Nanoparticles Loaded with Pyrene-Ended Poly(DI-Lactic Acid). *Int. J. Pharm.* **2008**, 358 (1–2), 271–277.
 - (28) Makino, A.; Hara, E.; Hara, I.; Yamahara, R.; Kurihara, K.; Ozeki, E.; Yamamoto, F.; Kimura, S. Control of in Vivo Blood Clearance Time of Polymeric Micelle by Stereochemistry of Amphiphilic Polydepsipeptides. *J. Control. Release* **2012**, 161 (3), 821–825.
 - (29) Chen, L.; Xie, Z.; Hu, J.; Chen, X.; Jing, X. Enantiomeric PLA-PEG Block Copolymers and Their Stereocomplex Micelles Used as Rifampin Delivery. *J. Nanoparticle Res.* **2007**, 9 (5), 777–785.
 - (30) Kang, N.; Perron, M. È.; Prud’Homme, R. E.; Zhang, Y.; Gaucher, G.; Leroux, J. C. Stereocomplex Block Copolymer Micelles: Core-Shell Nanostructures with Enhanced Stability. *Nano Lett.* **2005**, 5 (2), 315–319.
 - (31) Ma, C.; Pan, P.; Shan, G.; Bao, Y.; Fujita, M.; Maeda, M. Core-Shell Structure, Biodegradation, and Drug Release Behavior of Poly(Lactic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) Block Copolymer Micelles Tuned by Macromolecular Stereostructure. *Langmuir* **2015**, 31 (4), 1527–1536.
 - (32) Levchenko, T. S.; Rammohan, R.; Lukyanov, A. N.; Whiteman, K. R.; Torchilin, V. P. Liposome Clearance in Mice: The Effect of a Separate and Combined Presence of Surface Charge and Polymer Coating. *Int. J. Pharm.* **2002**, 240 (1–2), 95–102.
 - (33) Zhao, Z.; Ukidve, A.; Krishnan, V.; Mitragotri, S. Effect of Physicochemical and Surface Properties on in Vivo Fate of Drug Nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, 143, 3–21.
 - (34) Shalgunov, V.; Zaytseva-Zotova, D.; Zintchenko, A.; Levada, T.; Shilov, Y.; Andreyev, D.; Dzhumashev, D.; Metelkin, E.; Urusova, A.; Demin, O.; McDonnell, K.; Troiano, G.; Zale, S.; Safarova, E. Comprehensive Study of the Drug Delivery Properties of Poly(L-Lactide)-

- Poly(Ethylene Glycol) Nanoparticles in Rats and Tumor-Bearing Mice. *J. Control. Release* **2017**, *261*, 31–42.
- (35) Yang, Q.; Jones, S. W.; Parker, C. L.; Zamboni, W. C.; Bear, J. E.; Lai, S. K. Evading Immune Cell Uptake and Clearance Requires PEG Grafting at Densities Substantially Exceeding the Minimum for Brush Conformation. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (4), 1250–1258.
 - (36) Xu, Q.; Ensign, L. M.; Boylan, N. J.; Schön, A.; Gong, X.; Yang, J. C.; Lamb, N. W.; Cai, S.; Yu, T.; Freire, E.; Hanes, J. Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus *Ex Vivo* and Distribution *in Vivo*. *ACS Nano* **2015**, *9* (9), 9217–9227.
 - (37) Sakai-Kato, K.; Nanjo, K.; Kawanishi, T.; Okuda, H.; Goda, Y. Size Exclusion Chromatography Coupled with Multi-Angle Light Scattering Analysis of Physicochemical Properties of Block Copolymer Micelles. *Chromatography* **2015**, *36* (1), 29–32.
 - (38) Zhou, Y.; Qu, Y.; Yu, Q.; Chen, H.; Zhang, Z.; Zhu, X. Controlled Synthesis of Diverse Single-Chain Polymeric Nanoparticles Using Polymers Bearing Furan-Protected Maleimide Moieties. *Polym. Chem.* **2018**, *9* (23), 3238–3247.
 - (39) Ohnishi, N.; Yamamoto, E.; Tomida, H.; Hyodo, K.; Ishihara, H.; Kikuchi, H.; Tahara, K.; Takeuchi, H. Rapid Determination of the Encapsulation Efficiency of a Liposome Formulation Using Column-Switching HPLC. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441* (1–2), 67–74.
 - (40) Ran, C.; Chen, D.; Xu, M.; Du, C.; Li, Q.; Jiang, Y. A Study on Characteristic of Different Sample Pretreatment Methods to Evaluate the Entrapment Efficiency of Liposomes. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1028*, 56–62.
 - (41) Song, W.; Tweed, J. A.; Visswanathan, R.; Saunders, J. P.; Gu, Z.; Holliman, C. L. Bioanalysis of Targeted Nanoparticles in Monkey Plasma via LC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (21), 13874–13882.
 - (42) Varache, M.; Ciancone, M.; Couffin, A. C. Optimization of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Analysis of Drug-Loaded Lipid Nanoparticles and Its Application to the Determination of Leakage and Release Profiles. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109* (8), 2527–2535.
 - (43) Some, D.; Johann, C. Introduction WP2611: Characterization of Nanopharmaceuticals with Field-Flow Fractionation and Light Scattering (FFF-MALS-DLS), **2021**.
<https://www.wyatt.com/library/application-notes/nanoparticle-drug-delivery-characterization-by-fff-mals-dls.html>
 - (44) Diou, O.; Greco, S.; Beltran, T.; Lairez, D.; Authelin, J. R.; Bazile, D. A Method to Quantify the Affinity of Cabazitaxel for PLA-PEG Nanoparticles and Investigate the Influence of the Nano-Assembly Structure on the Drug/Particle Association. *Pharm. Res.* **2015**, *32* (10), 3188–3200.
 - (45) Karnik, R.; Gu, F.; Basto, P.; Cannizzaro, C.; Dean, L.; Kyei-Manu, W.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nano Lett.* **2008**, *8* (9), 2906–2912.

- (46) Thorat, A. A.; Dalvi, S. V. Liquid Antisolvent Precipitation and Stabilization of Nanoparticles of Poorly Water Soluble Drugs in Aqueous Suspensions: Recent Developments and Future Perspective. *Chem. Eng. J.*, **2012**, 181–182, 1–34.
- (47) Zhang, Y.; Jin, T.; Zhuo, R. X. Methotrexate-Loaded Biodegradable Polymeric Micelles: Preparation, Physicochemical Properties and *in Vitro* Drug Release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2005**, 44 (2–3), 104–109.
- (48) Silva DF; Reis LES; Machado MGC; Dophine DD; de Andrade VR; de Lima WG; Andrade MS; Vilela JMC; Reis AB; Pound-Lana G; Rezende SA; Mosqueira VCF. Repositioning of Tamoxifen in Surface-Modified Nanocapsules as a Promising Oral Treatment for Visceral Leishmaniasis. *Pharmaceutics*. **2021**, 13(7), 1061.
- (49) Jelonek K; Li S; Kasperczyk J; Wu X; Orchel A. Effect of polymer degradation on prolonged release of paclitaxel from filomicelles of polylactide/poly(ethylene glycol) block copolymers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, **2017**, 75, 918-925.
- (50) Ohnishi, N.; Tanaka, S.; Tahara, K.; Takeuchi, H. Characterization of Insulin-Loaded Liposome Using Column-Switching HPLC. *Int. J. Pharm.* **2015**, 479 (2), 302–305.
- (51) Li, H.; Diao, M.; Zhang, S.; Wang, K.; Xue, C. Novel Polymeric Micelles of AB 2 Type α -Methoxy- Poly(Ethyleneglycol)-b-Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate) 2 Copolymers as Tamoxifen Carriers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, 9 (8), 4805–4811.
- (52) Webb, B. A.; Chimenti, M.; Jacobson, M. P.; Barber, D. L. Dysregulated PH: A Perfect Storm for Cancer Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11 (9), 671–677.
- (53) He, X.; Li, J.; An, S.; Jiang, C. PH-Sensitive Drug-Delivery Systems for Tumor Targeting. *Ther. Deliv.* **2013**, 4 (12), 1499–1510.
- (54) Abouelmagd SA; Sun B; Chang AC; Ku YJ; Yeo Y. Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles: are we doing it right? *Mol Pharm.* **2015**, 12(3), 997-1003
- (55) Takeda, K. M.; Yamasaki, Y.; Dirisala, A.; Ikeda, S.; Tockary, T. A.; Toh, K.; Osada, K.; Kataoka, K. Effect of Shear Stress on Structure and Function of Polyplex Micelles from Poly(Ethylene Glycol)-Poly(L-Lysine) Block Copolymers as Systemic Gene Delivery Carrier. *Biomaterials* **2017**, 126, 31–38.
- (56) Bresseleers, J.; Bagheri, M.; Lebleu, C.; Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Pijpers, I. A. B.; Mason, A. F.; Meeuwissen, S.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E.; van Hest, J. C. M. Tuning Size and Morphology of Mpeg-b-p(Hpma-Bz) Copolymer Self-Assemblies Using Microfluidics. *Polymers*. **2020**, 12 (11), 1–18.
- (57) O'Reilly Beringhs, A.; Ndaya, D.; Bosire, R.; Kasi, R. M.; Lu, X. Stabilization and X-Ray Attenuation of PEGylated Cholesterol/Polycaprolactone-Based Perfluorooctyl Bromide Nanocapsules for CT Imaging. *AAPS PharmSciTech.* **2021**, 22 (3), 1–13.
- (58) Rawal, M.; Singh, A.; Amiji, M. M. Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development. *Pharm. Res.* **2019**, 36 (11), 153.
- (59) Troiano, G.; Nolan, J.; Parsons, D.; Van Geen Hoven, C.; Zale, S. A Quality by Design

- Approach to Developing and Manufacturing Polymeric Nanoparticle Drug Products. *AAPS J.* **2016**, 18 (6), 1354–1365.
- (60) Riewe, J.; Erfle, P.; Melzig, S.; Kwade, A.; Dietzel, A.; Bunjes, H. Antisolvent Precipitation of Lipid Nanoparticles in Microfluidic Systems – A Comparative Study. *Int. J. Pharm.* **2020**, 579, 119167.
 - (61) Kulkarni, J. A.; Tam, Y. Y. C.; Chen, S.; Tam, Y. K.; Zaifman, J.; Cullis, P. R.; Biswas, S. Rapid Synthesis of Lipid Nanoparticles Containing Hydrophobic Inorganic Nanoparticles. *Nanoscale* **2017**, 9 (36), 13600–13609.
 - (62) Duanmu, Y.; Riche, C. T.; Gupta, M.; Malmstadt, N.; Huang, Q. Scale-up Modeling for Manufacturing Nanoparticles Using Microfluidic T-Junction. *IIE Trans.* **2018**, 50 (10), 892–899.
 - (63) Jeffs, L. B.; Palmer, L. R.; Ambegia, E. G.; Giesbrecht, C.; Ewanick, S.; MacLachlan, I. A Scalable, Extrusion-Free Method for Efficient Liposomal Encapsulation of Plasmid DNA. *Pharm. Res.* **2005**, 22 (3), 362–372.
 - (64) Matteucci, M. E.; Hotze, M. A.; Johnston, K. P.; Williams, R. O. Drug Nanoparticles by Antisolvent Precipitation: Mixing Energy versus Surfactant Stabilization. *Langmuir* **2006**, 22 (21), 8951–8959.
 - (65) Mori, S. Calibration of Size Exclusion Chromatography Columns for Molecular Weight Determination of Poly(Acrylonitrile) and Poly(Vinylpyrrolidone) in N,N-Dimethylformamide. *Anal. Chem.* **1983**, 55 (14), 2414–2416.
 - (66) Krishnan, P. S. G.; Veeramani, S.; Vora, R. H.; Chung, T. S.; Uchimura, S. I.; Sugitani, H. Molecular Mass Determination of Polyamic Acid Ionic Salt by Size-Exclusion Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, 977 (2), 207–212.
 - (67) Zhu, L.; Cheng, S. Z. D.; Calhoun, B. H.; Ge, Q.; Quirk, R. P.; Thomas, E. L.; Hsiao, B. S.; Yeh, F.; Lotz, B. Crystallization Temperature-Dependent Crystal Orientations within Nanoscale Confined Lamellae of a Self-Assembled Crystalline - Amorphous Diblock Copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (25), 5957–5967.
 - (68) Hamley, I. W.; Fairclough, J. P. A.; Terrill, N. J.; Ryan, A. J.; Lipic, P. M.; Bates, F. S.; Towns-Andrews, E. Crystallization in Oriented Semicrystalline Diblock Copolymers. *Macromolecules* **1996**, 29 (27), 8835–8843.
 - (69) Hann, N. D. Effects of Lithium Bromide on the Gel-Permeation Chromatography of Polyester-Based Polyurethanes in Dimethylformamide. *J Polym Sci Polym Chem Ed* **1977**, 15 (6), 1331–1339.
 - (70) Yang, Z.; Peng, H.; Wang, W.; Liu, T. Crystallization Behavior of Poly(ϵ -Caprolactone)/Layered Double Hydroxide Nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, 116 (5), 2658–2667.
 - (71) Wenwen Zhao, Blake Simmons, Seema Singh, Arthur Ragauskas, and G.; Cheng. From Lignin Association to Nano-/Micro-Particle Preparation: Extracting Higher Value of Lignin. *Green*

- Chem.*, **2016**, *18* (21), 5693–5700.
- (72) Lim, J. M.; Swami, A.; Gilson, L. M.; Chopra, S.; Choi, S.; Wu, J.; Langer, R.; Karnik, R.; Farokhzad, O. C. Ultra-High Throughput Synthesis of Nanoparticles with Homogeneous Size Distribution Using a Coaxial Turbulent Jet Mixer. *ACS Nano* **2014**, *8* (6), 6056–6065.
 - (73) Kim, Y.; Lee Chung, B.; Ma, M.; Mulder, W. J. M.; Fayad, Z. A.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. Mass Production and Size Control of Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles through Controlled Microvortices. *Nano Lett.* **2012**, *12* (7), 3587–3591.
 - (74) Abstiens, K.; Goepferich, A. M. Microfluidic Manufacturing Improves Polydispersity of Multicomponent Polymeric Nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *49*, 433–439.
 - (75) Bertrand, N.; Grenier, P.; Mahmoudi, M.; Lima, E. M.; Appel, E. A.; Dormont, F.; Lim, J. M.; Karnik, R.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Mechanistic Understanding of *in Vivo* Protein Corona Formation on Polymeric Nanoparticles and Impact on Pharmacokinetics. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1).
 - (76) Esnaashari, S. S.; Amani, A. Optimization of Noscapine-Loaded MPEG-PLGA Nanoparticles and Release Study: A Response Surface Methodology Approach. *J. Pharm. Innov.* **2018**, *13* (3), 1–10.
 - (77) Zhou, H.; Fan, Z.; Li, P. Y.; Deng, J.; Arhontoulis, D. C.; Li, C. Y.; Bowne, W. B.; Cheng, H. Dense and Dynamic Polyethylene Glycol Shells Cloak Nanoparticles from Uptake by Liver Endothelial Cells for Long Blood Circulation. *ACS Nano* **2018**, *12* (10), 10130–10141.
 - (78) Mirkasymov, A. B.; Zelepukin, I. V.; Nikitin, P. I.; Nikitin, M. P.; Deyev, S. M. In Vivo Blockade of Mononuclear Phagocyte System with Solid Nanoparticles: Efficiency and Affecting Factors. *J. Control. Release* **2021**, *330*, 111–118.
 - (79) Li, H.; Jin, K.; Luo, M.; Wang, X.; Zhu, X.; Liu, X.; Jiang, T.; Zhang, Q.; Wang, S.; Pang, Z. Size Dependency of Circulation and Biodistribution of Biomimetic Nanoparticles: Red Blood Cell Membrane-Coated Nanoparticles. *Cells* **2019**, *8* (8), 881.
 - (80) Caster, J. M.; Yu, S. K.; Patel, A. N.; Newman, N. J.; Lee, Z. J.; Warner, S. B.; Wagner, K. T.; Roche, K. C.; Tian, X.; Min, Y.; Wang, A. Z. Effect of Particle Size on the Biodistribution, Toxicity, and Efficacy of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles in Chemoradiotherapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2017**, *13* (5), 1673–1683.
 - (81) Gaumet, M.; Vargas, A.; Gurny, R.; Delie, F. Nanoparticles for Drug Delivery: The Need for Precision in Reporting Particle Size Parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69* (1), 1–9.
 - (82) Wang, J. L.; Du, X. J.; Yang, J. X.; Shen, S.; Li, H. J.; Luo, Y. L.; Iqbal, S.; Xu, C. F.; Ye, X. D.; Cao, J.; Wang, J. The Effect of Surface Poly(Ethylene Glycol) Length on *in Vivo* Drug Delivery Behaviors of Polymeric Nanoparticles. *Biomaterials* **2018**, *182*, 104–113.
 - (83) Ahmad, A.; Khan, F.; Mishra, R. K.; Khan, R. Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (23), 10475–10496.
 - (84) Morales-Cruz, M.; Delgado, Y.; Castillo, B.; Figueroa, C. M.; Molina, A. M.; Torres, A.;

- Milián, M.; Griebenow, K. Smart Targeting to Improve Cancer Therapeutics. *Drug Des. Devel. Ther.* **2019**, *13*, 3753–3772.
- (85) Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Piovesana, S. Liposome Protein Corona Characterization as a New Approach in Nanomedicine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (19), 4313–4326.
- (86) Semple, S. C.; Chonn, A.; Cullis, P. R. Influence of Cholesterol on the Association of Plasma Proteins with Liposomes. *Biochemistry* **1996**, *35* (8), 2521–2525.
- (87) Lazarovits, J.; Sindhvani, S.; Tavares, A. J.; Zhang, Y.; Song, F.; Audet, J.; Krieger, J. R.; Syed, A. M.; Stordy, B.; Chan, W. C. W. Supervised Learning and Mass Spectrometry Predicts the in Vivo Fate of Nanomaterials. *ACS Nano* **2019**, *13* (7), 8023–8034.
- (88) Cao, Z. T.; Gan, L. Q.; Jiang, W.; Wang, J. L.; Zhang, H. B.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Yang, X.; Xiong, M.; Wang, J. Protein Binding Affinity of Polymeric Nanoparticles as a Direct Indicator of Their Pharmacokinetics. *ACS Nano* **2020**, *14* (3), 3563–3575.
- (89) Varnamkhashi, B. S.; Hosseinzadeh, H.; Azhdarzadeh, M.; Vafaei, S. Y.; Esfandyari-Manesh, M.; Mirzaie, Z. H.; Amini, M.; Ostad, S. N.; Atyabi, F.; Dinarvand, R. Protein Corona Hampers Targeting Potential of MUC1 Aptamer Functionalized SN-38 Core-Shell Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2015**, *494* (1), 430–444.
- (90) Su, G.; Zhou, X.; Zhou, H.; Li, Y.; Zhang, X.; Liu, Y.; Cao, D.; Yan, B. Size-Dependent Facilitation of Cancer Cell Targeting by Proteins Adsorbed on Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (44), 30037–30047.
- (91) Stefanick, J. F.; Omstead, D. T.; Ashley, J. D.; Deak, P. E.; Mustafaoglu, N.; Kiziltepe, T.; Bilgicer, B. Optimizing Design Parameters of a Peptide Targeted Liposomal Nanoparticle in an in Vivo Multiple Myeloma Disease Model after Initial Evaluation in Vitro. *J. Control. Release* **2019**, *311–312*, 190–200.
- (92) Tietjen, G. T.; Bracaglia, L. G.; Saltzman, W. M.; Pober, J. S. Focus on Fundamentals: Achieving Effective Nanoparticle Targeting. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24* (7), 598–606.
- (93) Yamashita, S.; Katsumi, H.; Shimizu, E.; Nakao, Y.; Yoshioka, A.; Fukui, M.; Kimura, H.; Sakane, T.; Yamamoto, A. Dendrimer-Based Micelles with Highly Potent Targeting to Sites of Active Bone Turnover for the Treatment of Bone Metastasis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *157*, 85–96.
- (94) Yamashita, S.; Katsumi, H.; Hibino, N.; Isobe, Y.; Yagi, Y.; Tanaka, Y.; Yamada, S.; Naito, C.; Yamamoto, A. Development of PEGylated Aspartic Acid-Modified Liposome as a Bone-Targeting Carrier for the Delivery of Paclitaxel and Treatment of Bone Metastasis. *Biomaterials* **2018**, *154*, 74–85.
- (95) Katsumi, H.; Yamashita, S.; Morishita, M.; Yamamoto, A. Bone-Targeted Drug Delivery Systems and Strategies for Treatment of Bone Metastasis. *Chem. Pharm. Bull.* **2020**, *68* (7), 560–566.
- (96) Erfani, A.; Seaberg, J.; Aichele, C. P.; Ramsey, J. D. Interactions between Biomolecules and Zwitterionic Moieties: A Review. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (7), 2557–2573.

- (97) García, K. P.; Zarschler, K.; Barbaro, L.; Barreto, J. A.; O'Malley, W.; Spiccia, L.; Stephan, H.; Graham, B. Zwitterionic-Coated "Stealth" Nanoparticles for Biomedical Applications: Recent Advances in Countering Biomolecular Corona Formation and Uptake by the Mononuclear Phagocyte System. *Small* **2014**, *10* (13), 2516–2529.
- (98) Low, S. A.; Yang, J.; Kopeček, J. Bone-Targeted Acid-Sensitive Doxorubicin Conjugate Micelles as Potential Osteosarcoma Therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (11), 2012–2020.
- (99) Jiang, T.; Yu, X.; Carbone, E. J.; Nelson, C.; Kan, H. M.; Lo, K. W. H. Poly Aspartic Acid Peptide-Linked PLGA Based Nanoscale Particles: Potential for Bone-Targeting Drug Delivery Applications. *Int. J. Pharm.* **2014**, *475* (1), 547–557.
- (100) Fu, Y. C.; Fu, T. F.; Wang, H. J.; Lin, C. W.; Lee, G. H.; Wu, S. C.; Wang, C. K. Aspartic Acid-Based Modified PLGA-PEG Nanoparticles for Bone Targeting: *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (11), 4583–4596.
- (101) Samkange, T.; D'Souza, S.; Obikeze, K.; Dube, A. Influence of PEGylation on PLGA Nanoparticle Properties, Hydrophobic Drug Release and Interactions with Human Serum Albumin. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71* (10), 1497–1507.
- (102) Perry, J. L.; Reuter, K. G.; Kai, M. P.; Herlihy, K. P.; Jones, S. W.; Luft, J. C.; Napier, M.; Bear, J. E.; Desimone, J. M. PEGylated PRINT Nanoparticles: The Impact of PEG Density on Protein Binding, Macrophage Association, Biodistribution, and Pharmacokinetics. *Nano Lett.* **2012**, *12* (10), 5304–5310.
- (103) Eliasof S; Lazarus D; Peters CG; Case RI; Cole RO; Hwang J; Schluep T; Chao J; Lin J; Yen Y; Han H; Wiley DT; Zuckerman JE; Davis ME. Correlating preclinical animal studies and human clinical trials of a multifunctional, polymeric nanoparticle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**, *110*(37), 15127-32.
- (104) Panyam, J.; Dali, M. M.; Sahoo, S. K.; Ma, W. Polymer Degradation and *in Vitro* Release of a Model Protein from Poly (D , L -Lactide- Co -Glycolide) Nano- and Microparticles. *J. Control. Release.*, **2003**, *92*, 173–187.
- (105) Ameller, T.; Marsaud, V.; Legrand, P.; Gref, R.; Barratt, G.; Renoir, J. M. Polyester-Poly(Ethylene Glycol) Nanoparticles Loaded with the Pure Antiestrogen RU 58668: Physicochemical and Opsonization Properties. *Pharm. Res.* **2003**, *20* (7), 1063–1070.
- (106) Lin, W.; Ma, G.; Yuan, Z.; Qian, H.; Xu, L.; Sidransky, E.; Chen, S. Development of Zwitterionic Polypeptide Nanoformulation with High Doxorubicin Loading Content for Targeted Drug Delivery. *Langmuir* **2019**, *35* (5), 1273–1283.
- (107) Martínez-Jothar, L.; Doukeridou, S.; Schiffelers, R. M.; Sastre Torano, J.; Oliveira, S.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. Insights into Maleimide-Thiol Conjugation Chemistry: Conditions for Efficient Surface Functionalization of Nanoparticles for Receptor Targeting. *J. Control. Release* **2018**, *282*, 101–109.
- (108) Liu, S.; Wang, X.; Yu, X.; Cheng, Q.; Johnson, L. T.; Chatterjee, S.; Zhang, D.; Lee, S. M.; Sun, Y.; Lin, T. C.; Liu, J. L.; Siegwart, D. J. Zwitterionic Phospholipidation of Cationic

- Polymers Facilitates Systemic mRNA Delivery to Spleen and Lymph Nodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (50), 21321–21330.
- (109) Tsermentseli, S. K.; Kontogiannopoulos, K. N.; Papageorgiou, V. P.; Assimopoulou, A. N. Comparative Study of PEGylated and Conventional Liposomes as Carriers for Shikonin. *Fluids* **2018**, *3* (2), 1–16.
- (110) Dai, Q.; Walkey, C.; Chan, W. C. W. Polyethylene Glycol Backfilling Mitigates the Negative Impact of the Protein Corona on Nanoparticle Cell Targeting. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (20), 5093–5096.
- (111) Wang, F.; Yang, J.; Zhao, J. Understanding Anti-Polyelectrolyte Behavior of a Well-Defined Polyzwitterion at the Single-Chain Level. *Polym. Int.* **2015**, *64* (8), 999–1005.
- (112) Kane, R. S.; Deschatelets, P.; Whitesides, G. M. Kosmotropes Form the Basis of Protein-Resistant Surfaces. *Langmuir* **2003**, *19* (6), 2388–2391.
- (113) Debayle, M.; Balloul, E.; Dembele, F.; Xu, X.; Hanafi, M.; Ribot, F.; Monzel, C.; Coppey, M.; Fragola, A.; Dahan, M.; Pons, T.; Lequeux, N. Zwitterionic Polymer Ligands: An Ideal Surface Coating to Totally Suppress Protein-Nanoparticle Corona Formation? *Biomaterials* **2019**, *219*, 119357.
- (114) Wang, H.; Shang, L.; Maffre, P.; Hohmann, S.; Kirschhöfer, F.; Brenner-Weiß, G.; Nienhaus, G. U. The Nature of a Hard Protein Corona Forming on Quantum Dots Exposed to Human Blood Serum. *Small* **2016**, *12* (42), 5836–5844.
- (115) Chen, D.; Parayath, N.; Ganesh, S.; Wang, W.; Amiji, M. The Role of Apolipoprotein- And Vitronectin-Enriched Protein Corona on Lipid Nanoparticles for *in Vivo* Targeted Delivery and Transfection of Oligonucleotides in Murine Tumor Models. *Nanoscale* **2019**, *11* (40), 18806–18824.
- (116) Abtians K; Maslanka Figueroa S; Gregoritz M; Goepferich AM. Interaction of functionalized nanoparticles with serum proteins and its impact on colloidal stability and cargo leaching. *Soft Matter*. **2019**, *15*(4), 709-720.
- (117) Mostafa, N. Y.; Brown, P. W. Computer Simulation of Stoichiometric Hydroxyapatite: Structure and Substitutions. *J. Phys. Chem. Solids* **2007**, *68* (3), 431–437.
- (118) Mueller, E.; Sikes, C. S. Adsorption and Modification of Calcium Salt Crystal Growth by Anionic Peptides and Spermine. *Calcif. Tissue Int.*, **1993**, *52* (1), 34–41.
- (119) Hideji, T.; Koichiro, M.; Masayuki, N.; Saburo, S. Interactions of Aspartic Acid, Alanine and Lysine with Hydroxyapatite. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37* (11), 2897–2901.
- (120) Gorbunoff, M. J. The Interaction of Proteins with Hydroxyapatite. I. Role of Protein Charge and Structure. *Anal. Biochem.* **1984**, *136* (2), 425–432.
- (121) Safavi-Sohi, R.; Maghari, S.; Raoufi, M.; Jalali, S. A.; Hajipour, M. J.; Ghassempour, A.; Mahmoudi, M. Bypassing Protein Corona Issue on Active Targeting: Zwitterionic Coatings Dictate Specific Interactions of Targeting Moieties and Cell Receptors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (35), 22808–22818.

- (122) Riley, T.; Stolnik, S.; Heald, C. R.; Xiong, C. D.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; Purkiss, S. C.; Barlow, R. J.; Gellert, P. R. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(Lactic Acid)-Poly(Ethylene Glycol) (PLA-PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir* **2001**, *17* (11), 3168–3174.
- (123) Zhang, X.; Ai, C.; Ma, J.; Xu, J.; Yang, S. Synthesis of Zwitterionic Shell Cross-Linked Micelles with PH-Dependent Hydrophilicity. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *356* (1), 24–30.
- (124) Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, and T., U. A Pharmacokinetic Analysis Program (MULTI) for Microcomputer. *J. Pharm. Dyn.* **1981**, *4*, 879–885.
- (125) Lai, P. L.; Hong, D. W.; Lin, C. T. Y.; Chen, L. H.; Chen, W. J.; Chu, I. M. Effect of Mixing Ceramics with a Thermosensitive Biodegradable Hydrogel as Composite Graft. *Compos. Part B Eng.* **2012**, *43* (8), 3088–3095.
- (126) Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51.
- (127) Dietz, H.; Rief, M. Protein Structure by Mechanical Triangulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (5), 1244–1247.