

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890161

研究課題名（和文） シクロデキストリン複合体形成による
タンパク質性薬物の PEG 化技術の構築研究課題名（英文） PEGylation of Protein Drugs utilizing the Complexation
with Cyclodextrin

研究代表者

東 大志 (HIGASHI TAISHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20613409

研究成果の概要（和文）：

本研究では、酵素活性の低下の少ないポリエチレングリコール（PEG）化技術の開発を目指し、シクロデキストリン（CyD）の包接特性を利用した新規 PEG 化（超分子 PEG 化）技術の構築を行った。具体的には、CyD/タンパク質性薬物結合体を調製し、CyD と安定な複合体を形成するアダマンタンを修飾した PEG を包接させることにより超分子 PEG 化タンパク質性薬物の調製を行った。なお、モデルタンパク質性薬物には血中滞留性の向上が望まれるインスリンを用いた。

インスリンとの反応性に優れるグルクロニルグルコシル-β-CyD（GUG-β-CyD）を選択し、GUG-β-CyD/インスリン結合体を調製した。結合体の酵素および熱に対する安定性は、インスリン単独と比べて優れることが示唆された。しかし、GUG-β-CyD/インスリン結合体の血糖降下作用は、インスリン単独と比べて減弱することが示唆された。

そこで、アダマンタンとインスリンの結合体を調製し、その生理活性を評価したところ、インスリン単独と同等の血糖降下作用を示した。次に、PEG と β-CyD の結合体を混合することで超分子 PEG 化インスリンを調製し、その血糖降下作用を評価したところ、インスリンやアダマンタン/インスリン結合体に比べて、活性が低下することなく血糖降下作用が持続する傾向を示した。

以上の結果から、超分子 PEG 化により活性を損なうことなくタンパク質性薬物の血中滞留性を増大できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to design the reversible PEGylation of proteins through the interaction of cyclodextrin (CyD) and guest-molecule modified polyethylene glycol (PEG).

First, we prepared the insulin conjugate with glucuronylglucosyl-β-CyD (GUG-β-CyD). Thermostability and enzymatic stability of the conjugate were improved compared to insulin alone. However, the hypoglycemic effect of the insulin was lost by the conjugation with GUG-β-CyD.

Next, we prepared insulin conjugate with guest-molecule (adamantane), and this conjugate retained the activity compared to intact insulin. In addition, supramolecular PEGylated insulin, consisting insulin/adamantine conjugate and PEGylated β-CyD showed prolonged hypoglycemic effect compared to insulin alone and insulin/adamantine conjugate.

The results suggest that supramolecular PEGylation increases circulating half-life of protein drugs without loss of the activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：シクロデキストリン、ポリエチレングリコール、タンパク質、超分子、制御放出

1. 研究開始当初の背景

タンパク質性薬物は微量で高活性を示し、優れた医薬品であるものの、1) 化学的、物理化学的に不安定である、2) 体内で容易に酵素分解される、3) 血中滞留性が低くバイオアベイラビリティが小さい、などの問題点を有しており、タンパク質製剤を開発するにはこれら問題点を克服することが必要となる。これに対し、タンパク質性薬物にポリエチレングリコール (PEG) を化学修飾すると、上記問題点が著しく改善されることから、複数の PEG 化タンパク質製剤が上市されている。しかし、ほぼ全てのタンパク質性薬物は PEG 化により活性を大きく損なうため、その治療効果を最大限に発揮できていない。特に高分子量の PEG ほど、血中滞留性が増大するものの、レセプターへの結合が大きく低下する結果、その活性が大きく損なわれる。例えば、インターフェロン α -2a (IFN) の場合、PEG 化 (PEG 平均分子量 40,000) することでその活性が 93 % 低下する。また、インスリンのような低分子量のタンパク質性薬物は、数千程度の分子量の PEG を修飾しただけで活性が大きく失われることから、その PEG 化は困難である。これまで、活性に大きな影響を与えないアミノ酸残基を標的とした部位特異的 PEG 化や、加水分解されやすい官能基を介した生分解性 PEG 化を行った報告があるものの、いずれも合成が複雑で実用性に欠け、さらに期待されたほどその活性が改善されていない。このような背景の下、タンパク質性薬物の活性を大きく損なうことなく、高分子量の PEG 鎖を修飾できる PEG 化技術の開発が熱望されている。

環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CyD) は、分子内に疎水性の空洞を有しており、空洞内に種々のゲスト分子を取り込むことで包接複合体を形成することが知られている。この複合体は非共有結合に基づく可逆

的な疎水性相互作用により形成され、希釈されたり、他の生体成分が存在したりすることで解離する。

2. 研究の目的

上記背景の下、筆者らは、CyD の可逆的な超分子的相互作用を利用することで、タンパク質性薬物の活性を大きく損なうことなく高分子量の PEG 鎖を修飾でき、その血中滞留性も増大するものと考えた。具体的には、タンパク質性薬物に CyD を導入し、CyD と強く相互作用するゲスト分子 (例えばアダマンタン) を修飾した PEG 誘導体を水溶液中で混合することで、非共有結合に基づく PEG 化タンパク質 (超分子 PEG 化タンパク質) を調製した (図 1)。得られた超分子 PEG 化タンパク質は、投与後、体内で希釈されたり、他の生体成分を CyD が包接したりすることで徐々に PEG 鎖を解離させ、活性を示すものと期待される。

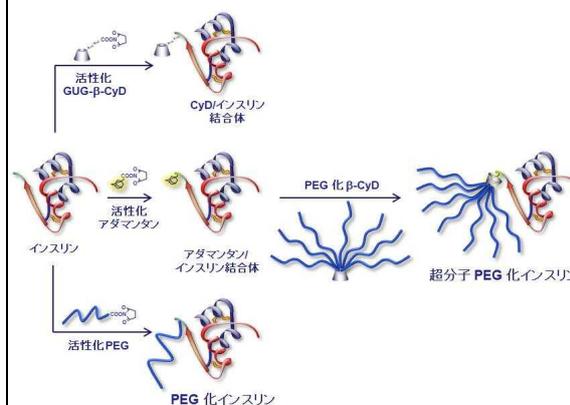


図 1. CyD/インスリン結合体、アダマンタン/インスリン結合体および超分子 PEG 化インスリンの調製スキーム

3. 研究の方法

インスリンとの反応性に優れるグルクロニルグルコシル-β-CyD (GUG-β-CyD) を選択し、dicyclohexylcarbodiimide (DCC) および N-hydroxysuccinimide (NHS) を用いて活性化した。これとインスリンを反応させ、CyD/インスリン結合体を得た。結合体の調製の確認は MALDI-TOF-MS にて行った。

結合体中の CyD が包接能を保持していることを確認する為、CyD の空洞に包接されると蛍光を発するプローブである sodium 2-(p-toluidino) naphthalene-6-sulfonate (TNS) 存在下において、蛍光スペクトルを測定した。また、結合体中のインスリンが高次構造を保持していることを確認する為、その円二色性スペクトルを測定し、インスリン単独と比較した。

結合体をリン酸緩衝液に溶解後、50°C で保温し、凝集していないインスリン量を経時的に測定することにより、熱安定性を評価した。

トリプシン存在下において、結合体溶液を 37°C で 6 時間保温し、未分解のインスリン量を HPLC にて測定することにより、酵素安定性を評価した。

ガラスもしくはポリプロピレン容器に結合体溶液を充填し、未吸着のインスリン量を分光光度計により測定することで、容器吸着性を評価した。

Wistar 系雄性ラット (200 g) の背部皮下に各種試料を投与し、経時的に血液を採取後、市販のグルコース測定キットを用いて、血糖値を測定することにより、血糖降下作用を評価した。

4. 研究成果

(1) CyD/インスリン結合体の調製

GUG-β-CyD のカルボキシル基を縮合剤で活性化し、インスリンと反応させることにより、GUG-β-CyD とインスリンとの結合体を調製した。MALDI-TOF-MS を測定したところ、結合体に由来するピークが観察されたことから、その調製を確認した。

TNS に GUG-β-CyD/インスリン結合体を添加すると、TNS 由来の蛍光強度が著しく増大したことから、上記結合体中の GUG-β-CyD は、包接能を有していることが確認された。

また、GUG-β-CyD/インスリン結合体の円二色性スペクトルを測定したところ、インスリン単独と概ね同等のスペクトルが観察されたことから、本結合体中のインスリンは高次構造を保持していることが示唆された。

(2) CyD/インスリン結合体の安定性

GUG-β-CyD/インスリン結合体をリン酸緩衝液に溶解し、50°C で保温した際のインスリンの残存量を定量した結果、インスリン単独では、7 日以内に 40% 以上のインスリンが凝集したのに対し、結合体では、7 日後もほぼ 100% のインスリンが残存していた。

さらに、GUG-β-CyD/インスリン結合体溶液をトリプシン存在下で 6 時間保温したところ、インスリン単独では約 35% のインスリンが分解したのに対し、結合体では、ほぼ 100% のインスリンが残存していた (図 2)。

以上の結果より、インスリンに GUG-β-CyD を結合させることにより、熱や酵素に対する安定性が向上することが示唆された。

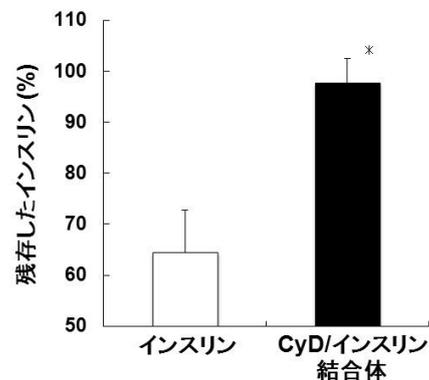


図 2. CyD/インスリン結合体の酵素安定性

(3) CyD/インスリン結合体の容器吸着性

GUG-β-CyD/インスリン結合体の、ガラスもしくはポリプロピレン容器に対する吸着性を測定した結果、いずれの容器においても、インスリン単独は 20% 程度容器に吸着するのに対し、結合体の吸着量は 5% 以下であった。これらの結果は、インスリンに GUG-β-CyD を結合させることにより、容器への吸着を抑制可能なことを示唆する。

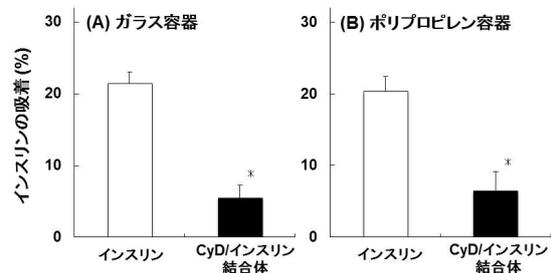


図 3. CyD/インスリン結合体の容器吸着性

(4) CyD/インスリン結合体の血糖降下作用

GUG-β-CyD/インスリン結合体の溶液をラット背部皮下に投与後、血糖降下作用を測定

した結果、インスリン単独に比べて、その活性が低下した。従って、インスリンに CyD を結合させ、超分子 PEG 化を行うことは困難と判断した。

(5) アダマンタン/インスリン結合体の調製

インスリンに GUG- β -CyD (分子量 1473) を結合させると、その活性が低下したため、ゲスト分子 (アダマンタン) をインスリンに結合させ、超分子 PEG 化インスリンを調製することとした。

アダマンタンカルボン酸のカルボキシル基を縮合剤で活性化後、インスリンに反応させることでアダマンタン/インスリン結合体を調製した。調製物の MALDI-TOF-MS を測定した結果、インスリンに 1 つのアダマンタンが導入された結合体の調製を確認した。

(6) アダマンタン/インスリン結合体の血糖降下作用

アダマンタン/インスリン結合体の溶液をラット背部皮下に投与後、血糖降下作用を測定した結果、インスリン単独に比べて、同等の血糖降下作用を示した。すなわち、アダマンタンを修飾してもインスリンの酵素活性は保持されることが示唆された。

(7) PEG 化 β -CyD の調製

β -CyD の 1 級ヒドロキシル基をアミノ化し、活性化された PEG (分子量 20,000) を反応させることにより、PEG 化 β -CyD を調製した。MALDI-TOF-MS の結果より、 β -CyD 1 分子あたりに、PEG 鎖が 1~4 本導入されていることが確認された。

(8) 超分子 PEG 化インスリンの

血糖降下作用

上述のアダマンタン/インスリン結合体と PEG 化 β -CyD をリン酸緩衝液で混合し、超分子 PEG 化インスリンを調製した。調製した試料を、ラット背部皮下に投与した結果、インスリン単独やアダマンタン/インスリン単独に比べ、活性を損なうことなく血糖降下作用が著しく持続した。以上の結果より、超分子 PEG 化により、タンパク質性薬物の活性を損なうことなく、血中滞留性を改善できる可能性が示唆された。

以上、得られた知見より、アダマンタンを導入したタンパク質性薬物と PEG 化 CyD を混合することにより、活性を損なうことなく、タンパク質性薬物を PEG 化可能なことが示唆された。

(9) 展望

今後、アダマンタン/インスリン結合体中のアダマンタンと、PEG 化 β -CyD 中の

β -CyD が、どのような相互作用様式で複合体を形成しているかを明らかにする。さらに、市販のインスリン製剤を対照に用いて、本技術の優位性を明らかにする。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 8 件)

① 弘津辰徳、東 大志、本山敬一、平山文俊、上釜兼人、有馬英俊、インスリンの熱および酵素安定性の向上を企図したグルクロニルグルコシル- β -シクロデキストリン結合体の調製、第 29 回日本薬学会九州支部大会、12/8-9 (2012)、熊本大学

② 弘津辰徳、東 大志、本山敬一、平山文俊、上釜兼人、有馬英俊、インスリンの安定性ならびに容器吸着性の改善を企図したグルクロニルグルコシル- β -シクロデキストリン結合体の調製、第 5 回シクロデキストリンワークショップ、10/27-28 (2012)、熊本大学

③ 弘津辰徳、東 大志、本山敬一、平山文俊、上釜兼人、有馬英俊、インスリンの熱および酵素安定性の改善を企図したグルクロニルグルコシル- β -シクロデキストリン結合体の調製、日本バイオマテリアル学会第 2 回九州地区講演会、9/14 (2012)、九州大学

④ 弘津辰徳、東 大志、本山敬一、平山文俊、上釜兼人、有馬英俊、インスリンの熱安定性を企図したグルクロニルグルコシル- β -シクロデキストリン結合体の調製、第 29 回シクロデキストリンシンポジウム、9/6-7 (2012)、星薬科大学 (東京)

⑤ 東 大志、弘津辰徳、本山敬一、有馬英俊、インスリンの製剤特性の改善を企図したグルクロニルグルコシル- β -シクロデキストリン結合体の調製、医療薬学フォーラム 2012 / 第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム、7/14-15 (2012)、福岡国際会議場

⑥ T. Hirotsu, T. Higashi, K. Motoyama, F. Hirayama, K. Uekama, H. Arima, Design and Evaluation of Insulin Conjugate with Glucuronylglucosyl- β -cyclodextrin for Stabilization of Bioactive Insulin, The 16th International Cyclodextrin Symposium, May 6-10 (2012), Nankai University (Tianjin, China)

⑦ 弘津辰徳、東 大志、本山敬一、有馬英俊、シクロデキストリン超分子特性を利用したタンパク質性薬物の PEG 化技術の構築、第 4 回創薬シンポジウム、11/25 (2011)、

熊本大学

⑧ 弘津辰徳、東 大志、本山敬一、有馬英俊、シクロデキストリン超分子特性を利用したタンパク質性薬物の PEG 化技術の構築、第 4 回シクロデキストリンワークショップ、10/29-30 (2011)、大分、湯布高原ビラ

[その他]

ホームページ等

<http://seizai.pharm.kumamoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 大志 (HIGASHI TAISHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20613409