

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07203

研究課題名(和文)多孔質PLGA粒子を用いたバイオ医薬品徐放プラットフォーム技術に関する研究

研究課題名(英文) Novel platform for sustained release of biopharmaceutical by using porous PLGA particle

研究代表者

尾関 哲也 (Ozeki, Tetsuya)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：60277259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬品は副作用が少なく効果の高い治療が期待できる一方で、生体内において分解を受けやすいため、注射による頻回投与を必要とされることが多い。そのため、バイオ医薬品を分解から保護し、長期間にわたって徐放可能な製剤化技術が求められている。本研究では、多孔性とカチオン性を持つポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)マイクロ粒子内にバイオ医薬品を吸着させた後、孔をふさぐというユニークな戦略でPLGAへのタンパク質を封入することに成功した。封入されたタンパク質はその機能を保ったまま長期間にわたって徐放することが示された。本研究はバイオ医薬品に対する新たな製剤化技術を提供するものと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品の徐放製剤は古くから開発されているものの、バイオ医薬品に対する徐放製剤は報告が少ない。最新のバイオ医薬品が研究される一方で、最近では、バイオ後続品(バイオシミラー)の承認も活発になっている。後発医薬品の開発においては、先発品にはない価値を創造することが期待されている。本研究で得られた成果は、バイオ医薬品の徐放化を通じてバイオシミラーの価値を高める製剤化技術を提供できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Although biopharmaceuticals are expected to provide highly effective treatment with fewer side effects, they are susceptible to degradation and often need to be administered frequently by injection. Therefore, there is a need for a formulation technology that protects biopharmaceuticals from degradation and enables sustained release. In this study, we succeeded in encapsulating proteins into poly(lactic acid)-glycolic acid copolymer (PLGA) using a unique strategy; adsorbing the biopharmaceutical within porous and cationic PLGA microparticles and then sealing the pores. It was shown that the encapsulated proteins were released slowly over a long period of time while retaining their function. This study provides a new formulation technology for biopharmaceuticals.

研究分野：製剤学

キーワード：徐放製剤 ポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)

## 1. 研究開始当初の背景

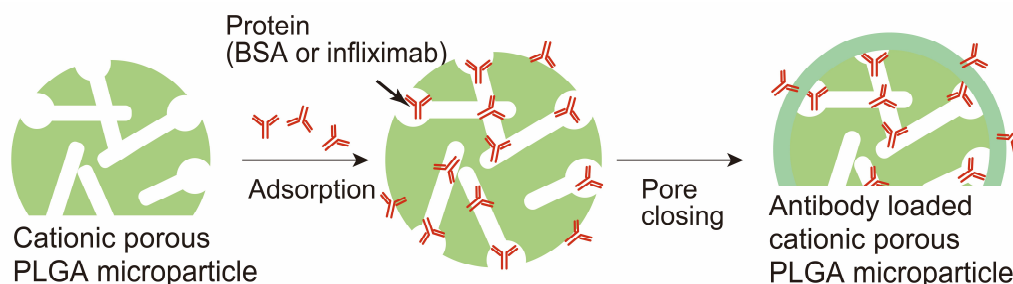
医薬品の形態は多様化しており、従来の低分子化合物にとどまらず、タンパク質・核酸・遺伝子・細胞などのバイオ技術を利用した医薬品候補の開発が盛んに行われている。バイオ医薬品は副作用が少なく効果の高い治療が期待できる一方で、生体内において分解を受けやすいため、注射による頻回投与を必要とされることが多い。そのため、バイオ医薬品を分解から保護し、長期間にわたって徐放可能な製剤化技術が求められている。

ポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) はさまざまな薬物を内部に封入することができ、自身の分解に伴って薬物を徐放する生分解性ポリマーである。PLGA 粒子を利用した徐放性製剤 (リュープリン) は、すでに臨床応用されている。我々の研究グループでは、これまでに PLGA 粒子を利用した薬物徐放技術の開発と、脳疾患・骨疾患・眼疾患に対する適応を行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに培ってきた PLGA 粒子による薬物徐放技術をバイオ医薬品に応用するためのプラットフォームを構築することである。一般的に、薬物を PLGA 粒子に封入するためには、薬物を有機溶媒と混和させる必要があるが、バイオ医薬品は有機溶媒中で変性・失活を起こす。そこで、有機溶媒との混和過程が無い、バイオ医薬品に適した薬物封入 PLGA 粒子の調製法を開発した。具体的には、多孔質カチオン性 PLGA 粒子を調製し、バイオ医薬品と静電的に吸着させた後、表面の孔を閉じるという戦略である (図 1)。バイオ医薬品のモデルとして抗体医薬品を封入した PLGA 粒子を調製しその機能評価を行った。さらに、PLGA 粒子に搭載するモデルとして、次世代のバイオ医薬品としての応用が期待されている細胞外小胞 (EVs) をがん治療に応用する萌芽的研究を行った。

図 1



## 3. 研究の方法

1) **タンパク質封入 PLGA 粒子の調製**: タンパク質封入 PLGA 粒子を調製する戦略を図 1 に示す。まず、有機溶媒に溶かした PLGA (Oil)、カチオン性ポリマー水溶性 (Water1)、炭酸水素アンモニウム水溶性 (Water2) からなる W1/O/W2 エマルジョンを作製した。この時に炭酸水素アンモニウムから発生するガスによって PLGA マイクロ粒子が多孔質になり、カチオン性ポリマーが表面を覆うことによって粒子は正電荷を帯びる。作製した多孔質カチオン性 PLGA マイクロ粒子とタンパク質を混合することでタンパク質を PLGA マイクロ粒子に吸着させた。次いで、タンパク質の脱離や分解を防ぐため、加熱により表面の孔を塞いだ。

2) **インフリキシマブ封入 PLGA 粒子の機能評価**: インフリキシマブ封入 PLGA 粒子からの薬物放出プロファイルを評価した。さらに、放出されたインフリキシマブが薬理作用を保っているかどうかを確かめるために、in vitro における TNF- $\alpha$  の中和活性を評価した。

3) **金ナノ粒子修飾-293T 細胞由来 EVs の抗腫瘍効果**: PLGA 粒子に搭載するモデルとして、293T 細胞由来 EVs を超遠心分離によって単離した。さらに EVs に金ナノ粒子 (AuNP) を静電的に修飾することで、レーザーに反応して抗腫瘍効果を発揮する AuNP-EVs 製剤を開発した。これをマウスメラノーマ細胞株 B16/BL6 に添加し、レーザーを照射した時の抗腫瘍効果を評価した。

## 4. 研究成果

1) 乳化条件を最適化することで、多孔質構造を持つ約 10  $\mu\text{m}$  の PLGA マイクロ粒子を得ることができた。正の表面電荷を示したことから、表面にカチオン性ポリマーがコーティングされたことが示された。モデルタンパク質としてアルブミンを封入したところ、搭載率 (粒子重量に占めるタンパク質の割合) は約 50% であった。これは、多孔質構造を持たない粒子や正電荷を持たない粒子よりも有意に高かったことから、表面の孔および正電荷がタンパク質の封入性に寄与していると考えられる。(国際誌に投稿済)

2) インフリキシマブ封入 PLGA 粒子は PBS 中において、50 日間にわたってインフリキシマブを徐放することが示された。さらに、放出されたインフリキシマブは、TNF- $\alpha$  に対する中和活性を保っていた。一方で、有機溶媒中でエマルジョンを形成する従来の手法で調製したインフリキシマブ封入 PLGA 粒子では、中和活性が顕著に減弱していた。以上より、本研究で提唱するタンパク質を PLGA 粒子内に封入する戦略は、タンパク質の機能を保持したまま徐放可能な方法であることが示された。(国際誌に投稿済)今回モデル薬物として用いたインフリキシマブは半減期が長いが、抗体フラグメントや他のタンパク質医薬品には半減期が短いものが多く、今回開発した製剤が有効となると考えている。

3) 超遠心分離で単離した 293T 細胞由来 EVs は約 130 nm であり、典型的な EVs の性質を示した。約 60 nm の PEG-NH<sub>2</sub> 修飾 AuNP と EVs を混合しインキュベーションすると、約 200 nm の AuNP/EVs 複合体が得られ、電子顕微鏡像より両者が静電的に結合している様子がみられた。調製した AuNP/EVs を B16/BL6 細胞に添加しレーザーを照射すると、高い抗腫瘍効果がみられたことからがん治療への応用可能性が示された。

以上、PLGA 粒子を基盤としたバイオ医薬品の徐放化技術の開発と、EVs に着目した新たながん治療法の探索を行った。本研究はバイオ医薬品に対する新たな製剤化技術を提供するものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花木 彩香、後藤 瑛一、田上 辰秋、尾関 哲也
2. 発表標題 多孔質PLGAマイクロ粒子を用いたバイオ医薬品徐放システムに関する検討
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田峻、花木彩香、小川昂輝、田上 辰秋、尾関 哲也
2. 発表標題 多孔性ポリ乳酸・グリコール酸共重合体マイクロ粒子を用いたバイオ医薬品の封入・放出制御技術と生理活性評価
3. 学会等名 第47回製剤・創剤セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤一輝、小川昂輝、田上 辰秋、尾関 哲也
2. 発表標題 光刺激応答性細胞外小胞/金ナノスター複合体 の調製とメラノーマに対する殺細胞効果
3. 学会等名 日本薬剤学会 第38年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田上 辰秋  (Tagami Tatsuaki)  (10609887)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授    (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------