

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34428

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670016

研究課題名(和文)オリゴアルギニン固定化高分子を内包するナノ粒子を用いたバイオ医薬の経口吸収改善

研究課題名(英文) Enhancement of oral absorption of biological medicines through co-encapsulation with oligoarginine-linked polymers

研究代表者

佐久間 信至 (Sakuma, Shinji)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：80388644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬の経口吸収改善技術の開発が困難を極める要因として、技術の安全性と消化管内の希釈による技術の機能低下が挙げられる。我々は、薬物と吸収促進剤が共存するコアシェル型腸溶性微粒子を設計し、エレクトロスプレー法により同粒子を調製した。薬物と吸収促進剤が低分子有機化合物の場合、粒子化を通して両成分の消化管内動態を連動させることにより、吸収促進剤の効果は増強された。バイオ医薬のインスリンの経口吸収性はオリゴアルギニン固定化高分子により促進されたが、同効果は粒子化により低下した。処方成分間の相互作用が原因と考えられ、今後、処方の最適化が必要である。

研究成果の概要(英文)：There are a couple of problems that should be solved to develop oral formulations of biological medicines: safety of absorption enhancers and a reduction of efficacy of the enhancers through dilution in the gastrointestinal tract. We designed enteric-coated particles containing drugs and absorption enhancers. Electrospray deposition was applied for particle preparation. When both a drug and an absorption enhancer were organic compounds with low molecular weights, absorption-enhancing functions was boosted through their co-encapsulation. This was presumably because the drug was always accompanied by the enhancer during the gastrointestinal transit. Oral absorption of insulin was enhanced when it was co-administered with oligoarginine-linked polymers in a solution. When the dosage form was substituted with enteric-coated particles, insulin absorption was considerably reduced. This probably resulted from interactions between formulated substances.

研究分野：薬物送達学

キーワード：吸収促進 バイオ医薬 オリゴアルギニン オリゴアルギニン固定化高分子 エレクトロスプレー 腸溶性

1. 研究開始当初の背景

(1) 経口吸収改善技術の現状

現在、臨床応用されている医薬品の60%以上は経口投与製剤である。使いやすさや優れた安全性などの使用者側の利点や、安価な製造コストで高品質な製品が得られる供給者側の利点により、古くから汎用されてきた。一方、近年の医薬品開発は、従来の低分子有機化合物から、ペプチドやタンパク質、抗体、核酸など、標的分子に対する特異性が極めて高いバイオ医薬へシフトしている。バイオ医薬の多くは膜透過性が低く、消化管内において概して不安定であるため、経口投与後の吸収性が著しく悪い。ほとんどのバイオ医薬は注射剤として開発されており、利便性改善の観点から、バイオ医薬の経口吸収改善に関する研究が盛んに行われている。しかし、臨床的に価値のある経口吸収改善技術は見出されていない。また、従来の創薬手法においても、消化管から吸収されない低分子有機化合物が散見され、注射剤での開発を余儀なくされるほか、高度な粒子設計技術が求められる吸入剤として一部開発されている。

経口吸収改善技術の開発が困難を極める主な要因として、技術の安全性と消化管の広い空間で技術の機能不全を引き起こす希釈の問題が挙げられる。脂肪酸やキレート剤などの吸収促進剤は、バリアの本質である脂質二重膜の流動性を増大させたり細胞間隙を拡大させる。生体膜の性質や構造を変化させて膜透過性を促進しており、安全性上の問題を抱える。臨床応用された事例は、カプリン酸ナトリウムを処方したアンピシリン及びセフチゾキム坐剤だけである。また、経口投与された薬物と吸収促進剤の混合物が吸収部位の小腸に到達したとき、消化管内容液により相当希釈されている。吸収促進剤の効果は一般に濃度依存的であることに加え、単なる混合では薬物と吸収促進剤が近くに存在するように消化管内挙動を制御できないため、吸収促進剤の機能が最大限発揮されず、in vivoでの吸収促進効果が限定的になるケースが報告されている。

このように吸収促進技術の開発が困難を極める中、HIV ウイルスの感染機構の研究を通して、高い細胞膜透過性を有するタンパク質が見出された。このタンパク質の一次構造をもとに開発された膜透過ペプチドは、現状を打破する可能性を秘めた DDS キャリアとして精力的に研究されている。膜透過ペプチドは、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸に富む10残基程度のカチオン性オリゴペプチドであり、マクロピノサイトーシス(細胞が本来備えている貪食作用の一つであり、負電荷を有する細胞膜表面に静電的相互作用により濃縮された正電荷の分子が細胞内に取り込まれる現象)により細胞内へ取り込まれる。代表的な膜透過ペプチドとして、オリゴアルギニン、ペネトラチンなどが知られている。

(2) 研究代表者及び分担者が持つ技術

研究代表者は、オリゴアルギニンを側鎖に化学結合させた新規高分子を設計・合成し、新しいタイプの膜透過促進剤としての同高分子の可能性を追求している。同高分子のオリゴアルギニン鎖は、図1に示す機構(作業仮説)に基づき、マクロピノサイトーシスを誘導する。同ペプチド鎖の近くに存在する薬物は偶発的に細胞内に取り込まれ、また、オリゴアルギニン固定化高分子自体は細胞内に取り込まれないため、その作用は持続する。鼻腔内、細胞培養セルなど、限られた空間に同高分子と低膜透過性薬物が共存するとき、バイオ医薬の膜透過が促進されることを既の実証している。

別に研究代表者と研究分担者は、難溶性薬物の経口吸収性を改善する技術として同軸二重エレクトロスプレー法を共同研究している。薬物の微粒化・非晶質化を介して溶解度・溶解速度を高める技術戦略であり、複数のモデル薬物を用いた動物実験を通して、既にその有用性を証明している。また、本技術は、薬物と機能性材料を1つの微粒内封入する技術へ応用することができる。バイオ医薬とオリゴアルギニン固定化高分子の混合物を腸溶性高分子で被覆したコア-シェル型微粒(図2)は、希釈の問題を解決するプログラム粒子として期待される。

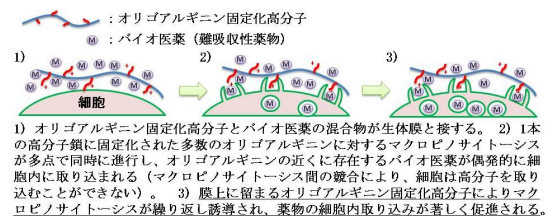


図1. オリゴアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構

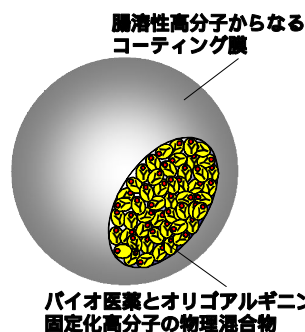


図2. コア-シェル型腸溶性微粒子の模式図

2. 研究の目的

本研究の目的は、オリゴアルギニン固定化高分子に同軸二重エレクトロスプレー法をインテグレートして得られる「コア(バイオ医薬及び同高分子の物理混合物)-シェル(腸溶性高分子)型微粒子」の経口吸収改善技術としての可能性を見極めることである。同微粒子は胃内で希釈されることなく小腸

に到達した後、コーティング膜が溶解し、内容物が放出される。小腸膜上において、オリゴアルギニン固定化高分子に近接するバイオ医薬は、同高分子により繰り返し誘導されるマクロピノサイトーシスを介して、効率的に小腸上皮細胞内に取り込まれ、全身循環血へ移行することが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腸溶性微粒子の調製

##### ロピナビル/リトナビル系

同軸二重エレクトロスプレー装置を用いて、窒素気流下、相対湿度を 20%RH 以下に保ちながら、ロピナビルとリトナビルを質量比 4:1 で含有する腸溶性微粒子（腸溶性高分子としてメタクリル酸コポリマーを使用）を調製した。別に、単独成分を含有する腸溶性微粒子を調製した。

（注）リトナビルはロピナビルの小腸上皮細胞内での代謝等を阻害してロピナビルの血中移行性を高める。ロピナビル：リトナビル = 4:1（質量）の混合物は HIV 感染症治療薬カレトラとして臨床で用いられている。

##### インスリン/D-オクタアルギニン固定化高分子系

と同様に、インスリンと D-オクタアルギニン固定化高分子を質量比 1:1~1:5 で含有する腸溶性微粒子を調製した。

#### (2) 腸溶性微粒子の物性評価

##### 粒子形態

走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて、微粒子の SEM 像を撮影した。その画像解析より平均粒子径（体積基準）を算出した。

##### 結晶形

示差走査熱量測定装置（DSC）及び粉末 X 線回折装置（XPRD）を用いて、融点及び XPRD パターンを測定することにより、微粒子に内包された薬物の結晶性を評価した。

##### In vitro 溶出性

第 16 改正日本薬局方溶出試験法第 2 法（パドル法）を用いて、腸溶性微粒子からの薬物の溶出性を評価した（試験液：日局第 2 液（pH：6.8）、試験液量：500 mL、パドル回転数：100 rpm、温度：37℃、薬物量：ロピナビルとして 2 mg）。

#### (3) 薬物の吸収性

##### ロピナビル/リトナビル系

24 時間絶食した SD 系雄性ラットを用いた。無麻酔下、ゾンデを用いて、各種薬液や水に分散した腸溶性微粒子を経口投与した（ロピナビルとして 2 mg/2 mL/kg of rat）。投与後経時的に採血し、血漿中のロピナビル濃度を LCMS により測定した。

##### インスリン/D-オクタアルギニン固定化高分子系

24 時間絶食した ddY 系雄性マウスを用いた。麻酔下、開腹し、注射器を用いて、各種薬液や水に分散した腸溶性微粒子を十二指腸内投与した（インスリンとして 25 IU（約 1 mg）/2 mL/kg of mouse）。投与後経時的に採

血し、血漿中のインスリン濃度を ELISA 法により測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) ロピナビル/リトナビル系

まず、ロピナビル（LPV）とリトナビル（RTV）を用いて、薬物と吸収促進剤の消化管内動態の運動効果（図 2 に示すプログラム粒子化の意義）を検討した。ロピナビルとリトナビルを含有する腸溶性微粒子中の両薬物の質量比は設計通り 4:1 であり、同微粒子の平均粒子径は約 1 μm であった。DSC 及び XPRD の結果から、腸溶性微粒子内のロピナビルとリトナビルの非晶質化が確認された（各薬物を単独で含有する腸溶性微粒子でも同様の結果が得られた）。図 3 に示すように、エレクトロスプレー法を用いて非晶質化した薬物を含有する腸溶性微粒子とすることにより、ロピナビルとリトナビルの in vitro 溶出性は著しく改善された。図 4 及び表 1 に示すように、ロピナビルとリトナビルを含む溶液製剤の AUC はロピナビルを単独で含む溶液製剤の AUC の約 20 倍であり、ラットにおいてもロピナビルに対するリトナビルのブースター効果が確認された。また、ロピナビルとリトナビルを含有する腸溶性微粒子の AUC は各薬物を単独で含有する腸溶性微粒子を同時投与したときの AUC の約 3 倍であった。この上昇効果は、MRT の延長に依ると考えられたことから、薬物と機能性材料を消化管内で常に近接させることにより、同材料の機能がより効果的・持続的に現れることが確認された。以上の実験を通して、プログラム粒子化の意義が実証された。

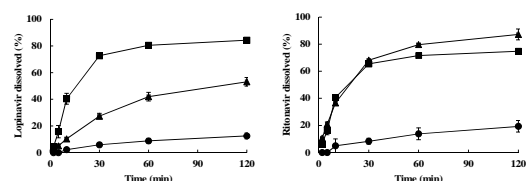


図 3. 各種 LPV 製剤からの in vitro 溶出性（○：バルク（原薬）、□：LPV 及び RTV を含有する腸溶性微粒子、△：LPV を単独で含有する腸溶性微粒子と RTV を単独で含有する腸溶性微粒子の混合物）

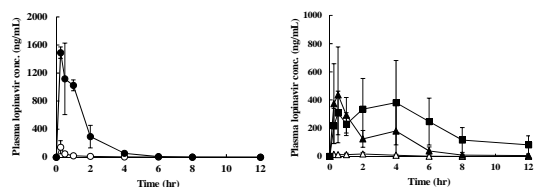


図 4. 各種 LPV 製剤からの in vivo 吸収性（○：LPV 及び RTV を含む溶液製剤、□：LPV を単独で含む溶液製剤、△：LPV 及び RTV を含有する腸溶性微粒子、△：LPV を単独で含有する腸溶性微粒子と RTV を単独で含有する腸溶性微粒子の混合物、△：LPV を単独で含有する腸溶性微粒子）

表 1. 各種製剤投与後の薬物動態学的パラメータ

Formulation	Drug loading		AUC <sub>0-∞</sub> (ng hr/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	MRT <sub>0-∞</sub> (hr)
	Lopinavir	Ritonavir			
プロピレングリコール溶液製剤	-	-	212 ± 44	147 ± 139	1.16 ± 0
	-	-	108.7 ± 49.3	142.6 ± 92.7	2.08 ± 1
腸溶性微粒子	LPV 及び RTV を含有する腸溶性微粒子	-	3173 ± 997	465.1 ± 206	6.30 ± 1
	LPV を単独で含有する腸溶性微粒子と RTV を単独で含有する腸溶性微粒子の混合物	-	1144 ± 268	526.1 ± 262	2.93 ± 1
	LPV を単独で含有する腸溶性微粒子	-	97.45 ± 26.1	21.93 ± 6.94	2.06 ± 0

(2) インスリン/D-オクタアルギニン系

次に、インスリンと D-オクタアルギニン固定化高分子が共存する腸溶性微粒子を用いて、本アイデアのバイオ医薬への適用を図った。図 5 に示すように、水溶液状態で十二指腸内に投与されたインスリンは、投与数分後に血中に検出された。投与 15 分以降で血中にほとんど検出されなかった理由として、腸内酵素によるインスリンの分解が考えられた。水溶液状態で D-オクタアルギニン固定化高分子をインスリンと共投与したとき、ばらつきは大きいものの、同高分子の投与量依存的にインスリンの吸収は促進された（図 5 左）。しかし、投与 15 分時点でその促進効果は消失しており、D-オクタアルギニン固定化高分子はインスリンの安定化には寄与しないと考えられた。インスリンと同量の D-オクタアルギニン固定化高分子を含有する腸溶性微粒子を十二指腸内投与したところ、インスリンの吸収はインスリン単独投与に比べて低下した（図 5 右）。高分子量を 5 倍に増やした結果、インスリン単独投与の約 2 倍の AUC が得られたが、D-オクタアルギニン固定化高分子によるインスリンの吸収促進効果は、プログラム粒子化により著しく抑制されることが明らかとなった。アニオン性の腸溶性高分子とカチオン性の D-オクタアルギニン固定化高分子の静電的相互作用が同高分子の機能を阻害している可能性を鑑み、コーティング膜をノニオン性のポリビニルピロリドンに変更した。しかし、結果は変わらず、この問題の解決には至らなかった。

以上、オリゴアルギニン固定化高分子によるバイオ医薬の経口吸収促進効果は実証されたが、プログラム粒子化によるさらなる効果増強は達成できなかった。

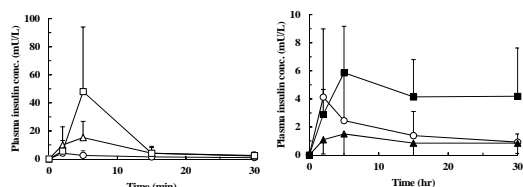


図 5. 各種インスリン製剤からの in vivo 吸収性（ $\circ$ ：インスリンを含む溶液製剤、 $\square$ ：インスリンと同量の D-オクタアルギニン固定化高分子を含む溶液製剤、 $\triangle$ ：インスリンと同量の D-オクタアルギニン固定化高分子を含有する腸溶性微粒子、 $\bullet$ ：インスリンと 5 倍量の D-オクタアルギニン固定化高分子を含有する腸溶性微粒子、 $\blacksquare$ ：インスリンと 5 倍量の D-オクタアルギニン固定化高分子を含有する腸溶性微粒子）

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shinji Sakuma, Satoshi Matsumoto, Narimoto Ishizuka, Kohta Mohri, Mayuko Fukushima, Chie Ohba, Kohsaku Kawakami, Enhanced boosting of oral absorption of lopinavir through electrospray co-encapsulation with ritonavir, J. Pharm. Sci., in press (2015 (予定)). 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

Shinji Sakuma, Satoshi Matsumoto, Narimoto Ishizuka, Kohta Mohri, Mayuko Fukushima, Chie Ohba, Kohsaku Kawakami, Enhanced boosting of oral lopinavir absorption through electrospray co-encapsulation with ritonavir, 17th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Salt Lake City, UT, June 15, 2015. 採択済み

松本諭, 石塚就元, 川上亘作, 佐久間信至, 薬物/吸収促進剤-包含型腸溶性微粒子を用いた経口吸収改善, 日本薬学会第 29 年会, 大宮ソニックシティ (埼玉県大宮市), 2014 年 5 月 20 日.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.labonet.info/sakuma/>

<http://www.nims.go.jp/bmc/group/ndg/kawakami/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 信至 (SAKUMA SHINJI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：80388644

(2) 研究分担者

川上 亘作 (KAWAKAMI KOHSAKU)

物質材料研究機構・生体機能材料ユニット・主幹研究員

研究者番号：00455271