

# 学位論文要旨

## 難吸収性薬物の経鼻粘膜吸収制御を目的とした PEG 修飾 poly-L-ornithine 及び poly-L-lysine の合成と機能性評価に関する研究

神矢 佑輔

Poly-L-ornithine (PLO) 及び poly-L-lysine (PLL) 等の塩基性アミノ酸ホモポリマーは、鼻粘膜などの上皮粘膜を介した難吸収性薬物の吸収を向上させる安全性の高い吸収促進剤として注目されている。しかし、それらの塩基性アミノ酸ホモポリマーは鼻粘膜に対して付着滞留性をほとんど示さないため、鼻腔内の異物除去機構により有効吸収部位から除去され、投与量に見合った吸収が得られない。本研究では、PLO 及び PLL の分子内に機能性要素として polyethylene glycol (PEG) を導入することで、鼻粘膜に対する付着滞留性を改善し、経鼻粘膜吸収促進効果を制御することを目的として、PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成とその機能性評価に関して、以下の 3 章に分けて検討した。

### 第 1 章 PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成及び物性評価

これまでに、経鼻薬物送達における吸収促進剤としての有用性を向上するための PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成方法は確立されていない。本研究では、PLO 及び PLL 側鎖の第一級アミンを標的とした PEG 修飾に着目し、種々分子量の PLO (MW 18.5 kDa: PLO (20) 及び 44.9 kDa: PLO (45))、PLL (MW 21.3 kDa: PLL (20) 及び 30.9 kDa: PLL (30)) 及びアミノ基反応性の官能基である *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 基を有する methoxy PEG (MW 42.5 kDa: mPEG (40)-NHS 及び 9.8 kDa: mPEG (10)-NHS) を用いて、種々質量比の PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成を試みた。その結果、PLO または PLL に対して、mPEG-NHS を過剰量添加し反応させることで、イオン交換スピンカラムによる分離が可能な PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成方法を確立した。合成した種々の PEG 修飾 PLO 及び PLL (PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30)) の PEG 修飾数を、トリニトロベンゼンスルホン酸吸光度法 (TNBS assay) 及び元素分析法の原理の異なる 2 つの方法で測定したところ、いずれの PEG 修飾 PLO 及び PLL においても両方法で近似した PEG 修飾比を示し、PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) の PEG 導入数はそれぞれ 3、4、9 及び 10/分子であることが明らかとなった。また、合成した種々の PEG 修飾 PLO 及び PLL の傾斜させたステンレススチール板上における滞留性を評価した結果、いずれの PEG 修飾 PLO 及び PLL においても、PEG 修飾による粘性の増大に起因すると考えられる滞留時間の延長が認められた。この結果は、PEG 修飾は塩基性アミノ酸ホモポリマーの付着滞留性を増大させ得ることを示唆しており、*in vivo* においても PEG 修飾 PLO 及び PLL が高い粘膜付着滞留性を有する可能性を示していた。

### 第 2 章 PEG 修飾 PLO 及び PLL の Caco-2 細胞単層膜を介した水溶性高分子薬物の透過促進効果及び tight junction (TJ) 関連タンパク質の局在性への影響

PLO や PLL と同様に、塩基性アミノ酸のホモポリマーである poly-L-arginine (PLA) は、細胞間隙部位に局在する TJ 関連タンパク質を内在化させ、細胞間隙経路を開口させることで、細胞傷害性を示すことなく水溶性高分子透過促進効果を示すことが報告されており、PLO や PLL に関しても同様の機構に

より透過促進効果を発揮すると推測される。しかし、塩基性アミノ酸ホモポリマーに対する PEG 修飾が透過促進効果に及ぼす影響について調査した報告はない。そこで、単層膜を介した透過性が経鼻吸収率と良好に相関することが知られている Caco-2 細胞を用いて、第 1 章で合成した種々の PEG 修飾 PLO 及び PLL のモデル水溶性高分子薬物 fluorescein isothiocyanate-dextran (MW 3.7 kDa: FD-4) 透過促進効果及び細胞に対する傷害性を評価した。その結果、検討したすべての PEG 修飾 PLO 及び PLL が、PEG 修飾前と同様に適用濃度依存的な FD-4 の透過促進効果並びに TJ のバリア機能の指標である膜抵抗値低下効果を示すことが確認された。最大効果は PEG 修飾前とほぼ同じであったが、その力価は 1/10 から 1/80 に低下した。これは主に、PEG 修飾によるアミノ基割合の低下や分子量増大による拡散性の低下、PEG 鎖の立体障害により正電荷が遮蔽されることによる上皮細胞表面との静電的相互作用の低下などによるものと考えられた。一方、細胞傷害性の比較において、未修飾の PLO 及び PLL は適用濃度依存的な細胞生存率の低下を示す傾向にあったが、PEG 修飾 PLO 及び PLL では高濃度まで細胞傷害性は認められなかった。また、PEG 修飾 PLO の適用後の TJ 関連タンパク質の局在は、未修飾の PLO と同様に細胞間隙部位から消失していたことから、PEG による修飾は、塩基性アミノ酸ホモポリマーの透過促進メカニズム自体を変化させるものではないことが示された。

### 第 3 章 PLO 及び PEG 修飾 PLO の経鼻吸収促進効果及び鼻腔内滞留効果

塩基性アミノ酸ホモポリマーの PEG 修飾による鼻腔内滞留性改善効果への影響を明らかにするために、第 2 章で高い透過促進効果を示し、細胞傷害性が認められなかった PEG (10)-PLO (45) を用いて、鼻腔内に投与した薬液が咽頭側に流出する開放系ラット及び鼻腔内に投与した薬液が鼻腔外へ流出しない閉鎖系ラットにおいて FD-4 経鼻投与実験を行った。開放系において、PEG 未修飾の PLO (45) を併用して FD-4 を経鼻投与した後の血漿中 FD-4 濃度は低く推移し、血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC) は閉鎖系の約 60% であった。この血漿中濃度の低下は、鼻腔内の吸収部位から投与液が除去されたことによる吸収促進効果の低下によって引き起こされたものと推察された。これに対し、PEG (10)-PLO (45) を併用して FD-4 を経鼻投与した後の AUC は閉鎖系の約 90% であり、血漿中 FD-4 濃度推移や吸収プロファイルもまた、閉鎖系と比較して遜色のないものであった。このことから、PEG の修飾により PLO に対して優れた滞留性改善効果が得られたことが示された。この滞留性改善効果の要因は明確ではないが、PEG が粘膜との相互作用により粘膜付着性を増大させることや、粘液による捕捉を回避することなどが報告されていること、第 1 章で言及した PEG の修飾による粘性の増大に起因する付着性の増大などが生じたことによって、閉鎖系と同程度の吸収促進効果を発揮した可能性が考えられた。

以上より、吸収促進作用を有する塩基性アミノ酸ホモポリマーに対して、機能性要素として PEG 側鎖を導入することによって、鼻腔内滞留性が向上し、量的及び速度的に難吸収性薬物の経鼻吸収性を十分に改善することが可能な機能性吸収促進剤を合成できることが明らかとなった。

## Thesis abstract

### Synthesis and functional assessment of PEGylated-poly-L-ornithine and PEGylated-poly-L-lysine for controlling absorption of poorly absorbable drugs across the nasal mucosa

Yusuke Kamiya

The homopolymeric basic amino acids (HPBAAs), such as poly-L-ornithine (PLO) and poly-L-lysine (PLL), are known as non-cytotoxic enhancers improving absorption of poorly absorbable drugs across epithelium such as the nasal mucosa. However, the transnasal absorption of the drugs corresponding to the dose of these enhancers has not been obtained because they do not exhibit mucoadhesion/retention in the nasal cavity. The aim of this study was to establish the synthesis methods of polyethylene glycol (PEG) modified (PEGylated)-PLO and PEGylated-PLL in order to control the nasal absorption enhancement ability, and evaluate the function of them.

The summary of this study is as follows:

#### 1. Synthesis and physical characterization of PEGylated-PLO and PEGylated-PLL

The synthesis methods of PEGylated-PLO and PEGylated-PLL in order to improve the availability as a nasal absorption enhancer have not yet been established. In this study, the syntheses of the PEGylated-PLO and PEGylated-PLL focusing on the primary amines of the side chain of HPBAAs as a targeting site of PEGylation were attempted. By the method, the syntheses of various PEGylated-PLO and PEGylated-PLL were performed using the various molecular weights of PLO (MW 18.5 kDa: PLO (20) and 44.9 kDa: PLO (45)), PLL (MW 21.3 kDa: PLL (20) and 30.9 kDa: PLL (30)) and methoxy-PEG-*N*-hydroxysuccinimide (MW 42.5 kDa: mPEG (40)-NHS and 9.8 kDa: mPEG (10)-NHS). Consequently, the synthesis methods of PEGylated-PLO and PEGylated-PLL separated by using ion exchange spin column were established by adding excess of PEG over PLO and PLL. The PEGylation ratio of the various PEGylated-PLO (PEG (40)-PLO (20) and PEG (10)-PLO (45)) and PEGylated-PLL (PEG (40)-PLL (20) and PEG (10)-PLL (30)) were evaluated by the elemental analysis and 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) assay. The PEGylation values obtained by the elemental analysis and TNBS assay were almost similar. Therefore, it was demonstrated that the containing PEG per molecule of PEG (40)-PLO (20), PEG (40)-PLL (20), PEG (10)-PLO (45) and PEG (10)-PLL (30) were 3, 4, 9 and 10, respectively. The evaluation of the retentivities of various PEGylated-PLO and PEGylated-PLL on the inclined stainless steel plate showed the prolongation of the retention time in all synthesized PEGylated-PLO and PEGylated-PLL considered to be caused by the increase in viscosity due to PEGylation. These results indicated that PEGylation may increase adhesive/retentive properties of HPBAAs, suggesting the possibility that PEGylated-PLO and PEGylated-PLL possess high mucoadhesive/retentive properties *in vivo*.

#### 2. Effects of PEGylated-PLO and PEGylated-PLL on the permeation of hydrophilic macromolecules across the Caco-2 cell sheet and the localization of tight junction (TJ) proteins

It has been reported that poly-L-arginine (PLA), one of the HPBAAs, enhances the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules by altering the localization of TJ proteins from the cell-cell junction to the intracellular space without causing cytotoxicity, presuming that PLO and PLL also show the permeation enhancing effect by the

same mechanism as PLA. However, there is no report concerning the impact of PEGylation of HPBAAs on permeation enhancing ability. The permeation enhancing effects of PEGylated-PLO and PEGylated-PLL were investigated using fluorescein isothiocyanate dextran (MW: 3.7 kDa, FD-4) as a model hydrophilic macromolecule in Caco-2 cell sheet which are known to have a good correlation between permeability across the sheet and the nasal absorbability in rats. The cytotoxicity of PEGylated-PLO and PEGylated-PLL were also evaluated. All PEGylated-PLO and PEGylated-PLL showed the FD-4 permeability increasing and transepithelial electrical resistance decreasing effects dose-dependently as before PEGylation. The maximal effects were almost the same as before PEGylation, but the titers after PEGylation were decreased to 1/10–1/80 compared with those of before PEGylation. It seemed to be mainly caused by reductions of the amine group abundance ratio and the diffusivity due to increased molecular weight by PEGylation, decrease the electrostatic interactions between the enhancers and the surface of epithelial cells due to the shielding of positive charge by steric hindrance of PEG chains. Unmodified PLO and PLL produced a decrease in cell viability dose-dependently, whereas PEGylated-PLO and PEGylated-PLL had no influence on the cell viability even at the highest concentration in this study. The localization of TJ proteins after PEGylated-PLO exposure were disappeared from the cell-cell junction as unmodified PLO, suggesting that the PEGylation did not change the permeation enhancing mechanisms of HPBAAs.

### **3. Effects of PEGylated-PLO on the nasal absorption enhancement and retentivity in the nasal cavity in rats**

In order to evaluate the improvement effect of retentivity of HPBAAs in the nasal cavity by PEGylation, intranasal administration (*i.n.*) experiments were performed using PEG (10)-PLO (45), which showed a high permeation enhancing ability without causing cytotoxicity as stated above, and FD-4 in closed system or open system, which cannot or can leak the dosage formulation to esophagus side, respectively. In the open system, transition of plasma FD-4 concentration after co-administration with unmodified PLO (45) was low, and the area under the plasma concentration time curve (AUC) was decreased to about 60% of that in the closed system. It was presumed that this decrease was due to removal of the administration solution from the absorption area in the nasal cavity, causing a decrease in absorption enhancing effect. In contrast, the AUC after co-administration with PEG (10)-PLO (45) was about 90% of that in the closed system, transition of plasma FD-4 concentration and FD-4 absorption profile were also not inferior to those of the closed system. These results indicated that remarkable retentivity improving effect on PLO was obtained by PEGylation. Although the factor of this retentivity improving effect was unclear, it had been reported that PEGylation increased mucoadhesion property by interaction with the mucosa and PEG chain avoided trapping by mucus. Moreover, PEGylation may have an effect of increasing adhesion due to increased viscosity as mentioned above. Therefore, PEGylated-PLO seemed to be able to show the absorption enhancing effect in the open system as effective as the closed system.

These findings revealed that a functional absorption enhancer, which can improve sufficiently the nasal absorbability of poorly absorbable drugs quantitatively and kinetically by increasing the retentivity in the nasal cavity can be synthesized by introducing PEG side chains as a functional component to HPBAAs.

# 論文審査結果の要旨

一般に粘膜を介した薬物の透過は、薬物の分子量の増大及び疎水性度の低下によって制限される。近年、多くのペプチド及びタンパク質性医薬品が実用化されているが、これらの医薬品は水溶性の高分子薬物であり、上皮粘膜を介した吸収はほとんど期待できない。そのため、投与方法はほとんどが注射によるものであり、非侵襲的な投与経路の開発には期待が大きい。

本論文では、塩基性アミノ酸のホモポリマーである poly-L-ornithine (PLO) 及び poly-L-lysine (PLL) の分子構造中に、機能的側鎖として polyethylene glycol (PEG) を導入した PEG 修飾 PLO 及び PLL の物性、*in vitro* における水溶性高分子透過促進効果、及び *in vivo* における水溶性高分子経鼻粘膜吸収促進効果並びに鼻腔内滞留性改善効果が評価されている。

第1章では、PEG 修飾 PLO 及び PLL の合成とその物性について議論されている。すなわち、分子量約 20 kDa と 45 kDa の PLO もしくは分子量約 20 kDa と 30 kDa の PLL と、分子量約 10 kDa と 40 kDa の PEG を組み合わせて、総分子量とその構成が異なる4種のグラフト共重合体 (PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30)) を合成し、元素分析法及び第一級アミノ基定量法の原理の異なる2つの方法でそれらの PEG 修飾数を算出して、PEG 導入数が 3~10/分子であることを示している。また、45° に傾斜させたステンレススチール板上における滞留性を評価し、いずれの PEG 修飾 PLO 及び PLL においても、PEG 修飾による粘性の増大に起因すると考えられる滞留時間の延長を確認している。この結果は、*in vivo* においても PEG 修飾 PLO 及び PLL が高い粘膜への付着滞留性を有する可能性を示している。

第2章では、PEG (40)-PLO (20)、PEG (40)-PLL (20)、PEG (10)-PLO (45) 及び PEG (10)-PLL (30) を用いて、Caco-2 細胞単層膜を介した fluorescein isothiocyanate dextran (MW 3.7 kDa, FD-4) 透過促進効果及び細胞傷害性が評価されている。その結果、検討したすべての PEG 修飾 PLO 及び PLL が、適用濃度依存的な FD-4 の透過促進効果及び膜間電気抵抗値低下効果を示すことが確認されたが、PEG 未修飾の PLO 及び PLL と比較してその力価は PEG (40)-PLO (20) 及び PEG (40)-PLL (20) では約 1/20、PEG (10)-PLO (45) では約 1/10、PEG (10)-PLL (30) では約 1/80 に低下していた。この力価の低下は、PEG 修飾によるアミノ基数の低下や分子量増大による拡散性の低下、PEG 鎖の立体障害による正電荷の遮蔽効果などによるものと考察されている。一方、細胞傷害性の比較において、PEG 未修飾 PLO 及び PLL は、低濃度から適用濃度依存的な細胞生存率の低下を示す傾向にあったが、PEG 修飾 PLO 及び PLL 適用後の細胞生存率は実験した濃度範囲において 100% を維持しており、有意な透過促進効果を示す濃度においても細胞傷害性は認められなかった。PEG 修飾によって、透過促進効果は失われずに細胞傷害性のみが消失したことから、塩基性アミノ酸ホモポリマーが示す透過促進効果は、細胞傷害性とは異なる機序

を含んでいることが示唆された。また、透過促進メカニズムの免疫染色を用いた評価において、他の塩基性吸収促進剤と同様 PEG (10)-PLO (45) においても、タイトジャンクション関連タンパク質の細胞間隙部位からの局在変化が認められた。

第 3 章では、PEG (10)-PLO (45) の鼻腔内滞留性改善効果が評価されている。鼻腔内に投与した薬液が咽頭側に流出できる開放系ラット及び鼻腔内に投与した薬液が鼻腔外へ流出しない閉鎖系ラット間の比較において、経鼻投与された FD-4 の血中濃度は、未修飾の PLO (45) では閉鎖系で高く開放系とは明らかな差が認められたのに対して、PEG (10)-PLO (45) では両系での差が小さく、PEG 修飾により優れた滞留性改善効果が得られたものと結論づけている。

以上より、本論文は、塩基性アミノ酸ホモポリマーに対する PEG 側鎖の導入が経鼻粘膜吸収促進効果を有効に発揮させる手法として有用であることを示したものであり、よく計画された実験計画に基づくもので、研究倫理上の問題もなく、十分な新規性も認められることから、本研究科が与える博士（薬学）の学位論文に値するものと判断した。