

## 核酸医薬の経粘膜投与を目指した微粒子製剤の設計

092A07 佐村聡太

製剤学講座

### 【背景・目的】

近年、特定のタンパク質を遺伝子レベルで制御する次世代の医薬品としてsiRNAやDNA decoyなどの核酸医薬が注目されている。NFκB decoy oligonucleotide (NDON) は、NFκB認識配列を有する二本鎖オリゴヌクレオチドで、過剰活性化されたNFκBのゲノムDNAへの結合を競合阻害することによりNFκB転写活性を正常レベルに戻すことが可能である。しかし、NDONは酸や熱、ヌクレアーゼによる分解を受け速やかに代謝・排泄され、さらに細胞内導入率も低いことから単独で投与しても治療効果を得るのが難しく、遺伝子導入用ベクターが必要となっている<sup>1)</sup>。

当研究室では、生体適合性・生体内分解性である乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA)を基剤とするサブミクロンサイズの薬物担体ナノ粒子を開発し、研究を進めてきた。例えば、PLGAナノ粒子内に核酸医薬を封入することで核酸を保護することが可能である。また、粒子表面をキトサン (CS)で修飾することにより、細胞内への粒子取り込み量を向上させることができる。さらに、凍結乾燥により粉末化が可能で保存安定性に優れる等の利点を有していることから、核酸医薬の薬物キャリアとして近年注目されている<sup>2)</sup>。

そこで本研究では、NDONの抗炎症効果作用を経粘膜的に発揮させることのできるPLGAナノ粒子製剤の設計を目的とし、以下の検討を行った。まず、NDONの細胞内導入量の向上を目指した。次に、NDON含有PLGAナノ粒子の経粘膜投与での有用性を確認するため、潰瘍性大腸炎 (UC)モデルラットに経口投与し、UCの治療効果を評価した。さらに、NDONを経肺投与製剤として設計する目的で、結合剤を用いず、非加熱で造粒が行える噴流層型バインドレス造粒装置<sup>3)</sup>を用いて吸入特性に優れた粉末吸入用ナノコンポジット顆粒の設計を試みた。

### 【方法】

PLGAナノ粒子は水中エマルション溶媒拡散法により調製した。PLGA及び薬物をアセトン・エタノール (2:1)

の混液に溶解させ、これを400rpmで攪拌下ポリビニルアルコール (PVA)中に滴下した。滴下後、得られたナノ粒子懸濁液を遠心分離し、精製水で再分散させた後、凍結乾燥することでナノ粒子凍結乾燥粉末を得た。ナノ粒子の蛍光マーカーには6-クマリンを、核酸医薬にはNDONを用いた。また、調製時、PVA水溶液中にカチオン性ポリマーのキトサン (CS)を添加することで、ナノ粒子表面のCSによる修飾を施した。NDONの細胞内導入量は、マクロファージ様細胞であるRAW264にNDON含有PLGANANO粒子を取り込ませ、Lipopolysaccharide (LPS)を一定時間作用させた後、培養液中のTNF-α量を測定することで評価した。また、*in vivo*評価については、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS)を溶解させた水を経口的に摂取させることでUCを誘発したラットを作製し、これにNDON含有PLGANANO粒子を投与し、下痢と下血の程度をスコア化することで抗炎症効果を評価した。経肺投与用ナノコンポジット顆粒は、ナノ粒子凍結乾燥粉末と吸入用乳糖を予備混合後、噴流層型バインドレス造粒法により調製した。得られた顆粒は、人口肺モデルであるツインインピンジャーを用いて*in vitro*吸入特性評価を行った。また、ラットへのシリンジ法による顆粒の経気管支投与により*in vivo*での肺内沈着分布評価も行った。

### 【結果及び考察】

#### NDON経粘膜投与用ナノ粒子設計

水中エマルション溶媒拡散法により、粒子径347 nm、ゼータ電位17.3 mV、NDON含有率5.6%のCS修飾PLGANANO粒子 (CS-PLGANANO粒子)を得た。未修飾ナノ粒子のゼータ電位はマイナスであったのに対し、粒子表面をCSで修飾することでゼータ電位がプラスにシフトし、マイナスに帯電している細胞表面との相互作用により細胞内への取り込み量は増大した。また、TNF-α産生抑制評価では、NDON溶液を投与した細胞と比較し、CS-PLGANANO粒子を投与した細胞はTNF-α放出量が低下した。*in vivo*での抗炎症効果評価においても、DSSの自由飲水

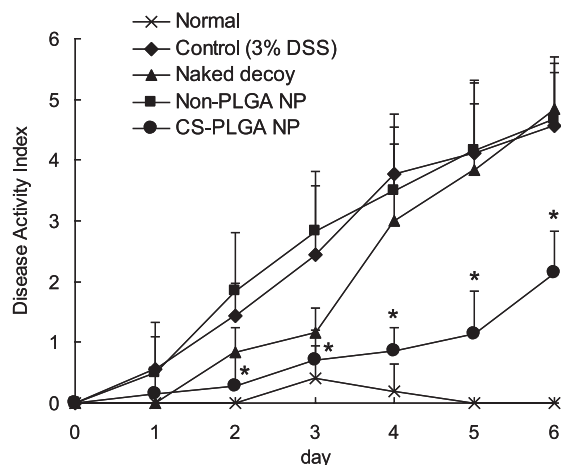


Fig. Effects of PLGA NS on DAI in DSS-induced ulcerative colitis in rats. Data are mean  $\pm$  SE of six rats. \* $P < 0.05$  compared with control (3% DSS)

開始と同時にNDON含有PLGAナノ粒子を投与することで、下痢と下血の指標であるDisease Activity Index (DAI)の上昇を抑え、さらに大腸組織中のMPO活性が有意に低下することが分かった。ナノ粒子を経口投与し6時間後の大腸粘膜を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、UC誘発ラットの大腸粘膜中にナノ粒子が侵入していることが観察された。以上のことから、NDONをナノ粒子製剤とすることで、酸やヌクレアーゼによるNDONの分解を防ぐことができ、さらに、ナノ粒子が炎症部位の破壊・潰瘍組織の粘膜バリア中に蓄積することでNDONの抗炎症効果を示したと考えられる。以上の結果から、NDONの経口投与による潰瘍性大腸炎の治療にはCS-PLGAナノ粒子が有用であることが示唆された。

#### バインドレス造粒による経肺投与製剤の設計

噴流層型バインドレス造粒装置により調製した顆粒は、球形で、指圧程度で容易に壊れる強度を有していた。この顆粒は、 $5\mu\text{m}$ 以下の一次粒子が凝集した平均粒子径が約 $300\mu\text{m}$ の二次粒子であり、粉体のハンドリング性に優れていた。ツインインピンジャーを用いて吸入特性評価したところ、ナノ粒子凍結乾燥粉末は、流動性が悪く吸入用デバイスに多くの粒子が付着するのに対し、ナノコンポジット顆粒では、Stage2へ到達する粒子割合が高く優れた吸入特性を示した。また、ナノ粒子調製時に凍結乾燥保護剤のマニトールを加えることで吸入特性が向上した。これは、マニトールを加えることでナノ粒子凍結乾燥粉末が針状の凝集体となりデバイスによるせん断力で容易に微細化されるためだと考えられる。また、吸入特性には、凍結乾燥PLGAナノ粒子粉末の一次物性が大きく影響しており、凍結乾燥で調製される粒子を微細化することで吸入特性は向上した。ラットを用いた *in*

*vivo*における吸入特性評価においても、ナノ粒子凍結乾燥粉末を投与した群に比べ、ナノコンポジット顆粒を投与した群では肺深部までナノ粒子を観察できた。このように噴流層型バインドレス造粒法によるナノコンポジット顆粒の造粒がNDONの経肺投与製剤の設計につながると考えられる。

以上より、核酸医薬の経口・経肺投与をはじめとする経粘膜投与製剤の設計には、PLGAナノ粒子が有用であることが示された。

#### 【文献】

- 1) Yriko Higuchi, S. Kawakami, M. Hashida : "Development of Cell-selective Targeting System of NF $\kappa$ B decoy for Inflammation Therapy", **YAKUGAKU ZASSHI** **128** (2), 209-218 (2008)
- 2) Kohei Tahara, S. Samura, K. Tsuji, H. Yamamoto, Y. Tsukada, Y. Bando, H. Tsujimoto, R. Morishita, Y. Kawashima : "Oral nuclear factor- $\kappa$ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease", **Biomaterials** **32**, 870-878 (2011)
- 3) Tsujimoto, H., K. Hara, Y. Tsukada, Y. Kawashima, S. Hatano : "Use of spouted bed type binderless granulation to design PLGA nano-composite granules for dry powder inhalation", **J.Soc. Powder Technol., Japan**, **44**, 459-464 (2007)