

シクロデキストリン polypseudorotaxane による PEG 化タンパク質
持続放出システムの構築

2009

東 大 志

Design and Evaluation of Sustained Release System for PEGylated
Proteins Utilizing Cyclodextrin Polypseudorotaxanes

Taishi Higashi

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- 1) Polypseudorotaxanes of Pegylated Insulin with Cyclodextrins: Application to Sustained Release System

T. Higashi, F. Hirayama, H. Arima, K. Uekama

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **17**, 1871-1874 (2007).

- 2) Design and Evaluation of Polypseudorotaxanes of Pegylated Insulin with Cyclodextrins as Sustained Release System

T. Higashi, F. Hirayama, S. Misumi, H. Arima, K. Uekama

Biomaterials, **29**, 3866-3871 (2008).

- 3) Slow-Release System of Pegylated Lysozyme Utilizing Formation of Polypseudorotaxanes with Cyclodextrins

T. Higashi, F. Hirayama, S. Yamashita, S. Misumi, H. Arima, K. Uekama

International Journal of Pharmaceutics, in press.

- 4) Polypseudorotaxane Formation of Randomly-pegylated Insulin with Cyclodextrins: Slow Release and Resistance to Enzymatic Degradation

T. Higashi, F. Hirayama, S. Misumi, K. Motoyama, H. Arima, K. Uekama

Chemical & Pharmaceutical Bulletin, submitted.

Design and Evaluation of Sustained Release System for PEGylated Proteins Utilizing Cyclodextrin Polypseudorotaxanes

Taishi Higashi

PEGylation technology has been widely used to improve therapeutic efficacies of a range of molecules, from proteins both small and large, through liposomes and viruses. For example, when poly(ethylene glycol) (PEG) is covalently attached to a protein, it transfers many of the polymer's favorable characteristics to the resulting conjugate, *i.e.* a number of benefits such as increased circulating half-life, enhanced proteolytic resistance, reduced antigenicity and immunogenicity, reduced aggregation, and improved bioavailability, *etc.*

Cyclodextrins (CyDs) are known to form polypseudorotaxanes with PEG. A number of applications of polypseudorotaxanes as a biomaterial are reported, however, little is known about the combination of PEGylated proteins/CyDs and their application to drug release controls. In this study, the polypseudorotaxanes of PEGylated proteins such as insulin and lysozyme with α -CyD and γ -CyDs were prepared and evaluated them as a sustained release system.

The results were summarized as follows:

- 1) The PEGylated insulin and lysozyme having 1-2 PEG chains were prepared by reacting the proteins with α -succinimidyl- ω -methoxy-polyoxyethylene (mPEG-OSu). The average degree of substitution of PEG was estimated by MALDI-TOF mass spectrometry and HPLC analysis.
- 2) Polypseudorotaxanes of the PEGylated proteins with CyDs were prepared by mixing aqueous solutions of both components and standing the solution for 12 h at 4 °C. α - and γ -CyDs gave crystalline precipitates of polypseudorotaxanes with the PEGylated proteins, whereas β -CyD did not give any crystalline polypseudorotaxanes.
- 3) According to the results of FT-IR spectra and powder X-ray diffraction patterns, it was concluded that α - and γ -CyDs form polypseudorotaxanes with PEGylated proteins by including one PEG chain and two PEG chains, respectively. In addition, the PEG chain was included in the hexagonal and tetragonal columnar

channels of the linearly aligned α -CyD and γ -CyD cavities, respectively, in the crystalline phase of the solid polypseudorotaxanes. The studies on polypseudorotaxane formations with the end-capped PEG derivatives (Zphe₂-PEG) and the yields of the polypseudorotaxanes suggested that both intermolecular and intramolecular complexes of the PEGylated proteins with γ -CyD coexist in the polypseudorotaxanes.

- 4) The release rate decreased in the order of PEGylated proteins alone > γ -CyD polypseudorotaxane > α -CyD polypseudorotaxane and depended on the amounts of the dissolution medium, concentration of CyDs in the medium or degree of substitution of PEG. In addition, the conformation and enzymatic stability were negligibly changed before and after the release, because of no change in CD spectra of the PEGylated insulin and the lytic activity of PEGylated lysozyme.
- 5) The γ -CyD polypseudorotaxane significantly sustained the plasma insulin level and hypoglycemic effect, because of the appropriate release rate and of the proteolytic resistance of PEGylated insulin. Moreover, its sustained effect became greater with increase in γ -CyD concentrations added in the injection medium. On the other hand, α -CyD polypseudorotaxane showed low plasma insulin level and hypoglycemic effect, because of its markedly slow dissociation and low effect of α -CyD on absorption or enzymatic activity of insulin. These results suggested that the release rate of the PEGylated proteins can be controlled by adjustment of concentration of CyDs in the medium.

These results indicated that the PEGylated proteins/CyD polypseudorotaxanes can work as a sustained drug release system, and the release rate of the PEGylated drug can be controlled by changing the threading and dethreading rates of the polypseudorotaxanes by adjustment of administration conditions such as amount of injection medium and concentration of CyDs in the medium. The PEGylation of drugs has been utilized to prolong systemic circulation of drugs due to increase in molecular weight. This prolongation *in vivo* can be further enhanced by controlling the release rate by the polypseudorotaxane formation, and this technology may be applicable, as one of sustained drug delivery techniques, not only to other PEGylated proteins and peptides, but also to PEGylated low molecular weight drugs or drug carrier, such as PEGylated liposome or microspheres.

シクロデキストリン polypseudorotaxane による PEG 化タンパク質 持続放出システムの構築

生命薬科学専攻 医療薬学講座 製剤設計学分野 東 大志

タンパク質性薬物をポリエチレングリコール (PEG) で化学修飾すると、物理化学的安定性の改善、免疫原性の減少、血中滞留性の延長など様々な問題点が改善されることから、数多くの PEG 化タンパク質が上市されている。本研究で対象とするシクロデキストリン (CyD) は PEG と難水溶性の包接複合体 (polypseudorotaxane) を形成することが報告されているが、PEG 化タンパク質と CyD との polypseudorotaxane 形成およびそれらの医薬への応用に関する報告は皆無である。そこで本研究では、polypseudorotaxane 形成により PEG 化タンパク質の溶解性を制御し、持続性に優れたタンパク質製剤の構築を企図した。

モデルタンパク質にインスリンとリゾチームを用いて、PEG 化タンパク質およびそれらの CyD polypseudorotaxanes を調製し、polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質の放出挙動ならびに放出後の PEG 化タンパク質の高次構造や生理活性を検討した。特に、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes をラットに皮下投与後の血漿中インスリン濃度および血糖降下作用を詳細に検討した。

以下に本研究で得られた知見を要約する。

- 1) モデルタンパク質に mPEG-OSu を反応させて、PEG 鎖が約 1 本が結合した PEG 化インスリンおよび PEG 化リゾチームを調製した。各タンパク質に導入された PEG 鎖の置換度は MALDI-TOF Mass スペクトルおよび HPLC 分析から算出した。
- 2) α - および γ -CyD 水溶液に PEG 化タンパク質を添加し、4°C で 12 時間静置すると、PEG 化タンパク質/ α - および γ -CyD polypseudorotaxanes の結晶性沈殿物が形成された。一方、 β -CyD はこれら PEG 化タンパク質と難水溶性の polypseudorotaxane を形成しなかった。
- 3) PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxanes 沈殿物の FT-IR スペクトルおよび粉末 X 線回折パターンから、 α - および γ -CyD が PEG 化タンパク質の PEG 鎖を包接して CyD polypseudorotaxanes を形成すること、さらに、 α -CyD および γ -CyD polypseudorotaxanes は結晶内においてそれぞれ六方晶系および立方晶系筒型構造を有するものと推定された。また、CyD polypseudorotaxanes の化学量論比から、 α -CyD は PEG 化タンパク質の PEG 鎖 1 本と、一方 γ -CyD は PEG 鎖 2 本と polypseudorotaxanes を形成するものと推定された。さらに、end-capped PEG 誘導体を用いた polypseudorotaxane 形成、 γ -CyD polypseudorotaxane の収率におよぼす γ -CyD 水溶液量の影響を検討した結果、空洞径が大きな γ -CyD は、PEG 化タンパク質 2 分子の PEG 鎖が平行に並んで包接された分子間 polypseudorotaxane のみならず、PEG 化タンパク質 1 分子中の PEG 鎖が折れ曲がって包

接された分子内 polypseudorotaxane も形成する可能性が示唆された。

- 4) CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質の放出は抑制され、放出速度は PEG 化タンパク質 \gg γ -CyD polypseudorotaxane $>$ α -CyD polypseudorotaxane の順に遅延した。Polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質の放出速度は、溶出溶媒量の減少、溶媒中の遊離 CyD 濃度の上昇、タンパク質分子への PEG 導入数の増大に伴い抑制された。さらに、PEG 化インスリンの CD スペクトルおよび PEG 化リゾチームを用いた溶菌活性の測定結果から、CyD polypseudorotaxanes から放出される PEG 化タンパク質は PEG 化タンパク質単独と同様の高次構造および酵素活性を保持し、生理活性に影響をおよぼさないことが示唆された。
- 5) PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane をラット背部に皮下投与すると、血漿中インスリン濃度や血糖降下作用はインスリンや PEG 化インスリン単独投与に比べて有意に増大するとともに、顕著な持続効果が観察された。この理由として、 γ -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出速度が適切であったこと、 γ -CyD polypseudorotaxane 形成により PEG 化インスリンの酵素安定性が向上したことなどが考えられた。一方、 α -CyD polypseudorotaxane をラット背部に皮下投与しても、血漿中インスリン濃度の上昇および血糖降下作用はほとんど観察されなかった。この理由として、 α -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出が極めて遅いため、血漿中 PEG 化インスリン濃度が不十分であること、インスリンの吸収や活性に対する α -CyD 自身の負の影響などが考えられた。これらの結果は、CyD の種類、CyD polypseudorotaxanes を希釈する溶媒中の CyD 濃度を調節することにより、PEG 化インスリンの放出速度を制御可能なことを示唆する。
- 6) PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane は市販の持続性インスリン製剤に比べて血糖降下作用を若干遅延した。

以上の知見から、PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質の放出速度は、CyD の種類や添加する CyD 濃度を調節することにより制御可能であり、polypseudorotaxanes は持続性タンパク質製剤の構築に有用なことが示唆された。

現在、様々な PEG 化タンパク質性薬物に関する薬効の持続化、免疫原性の軽減、化学的・物理化学的安定性の改善などが行われ、臨床使用例も増加している。本システムは、1) 調製が簡便であり、高収率である、2) 有機溶媒を用いないため、安全性に優れる、3) CyDs の安全性は確立されており、臨床使用例も多い、4) CyDs は比較的安価である、5) 他の PEG 化タンパク質のみならず PEG 化低分子薬物あるいは他の PEG 化 DDS キャリア (例えば、マイクロスフェア、リポソームなど) へも応用可能である、などの利点を有するため、実際応用が期待される。

本研究で得られた polypseudorotaxanes 形成に関する知見は、PEG 化タンパク質性薬物の皮下注射時の持効化のみならず、他の剤形への応用を企図する際の有用な基礎資料になるものと考えられる。

目次

緒言	1
結果と考察	
第 1 章 PEG 化インスリン/シクロデキストリン (CyD) polypseudorotaxanes の調製および持続性製剤としての応用	6
第 1 節 序	6
第 2 節 PEG 化インスリンの調製と構造	7
第 3 節 PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の調製と構造	9
第 1 項 PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の調製	9
第 2 項 沈殿物形成の肉眼的観察	9
第 3 項 FT-IR スペクトル	11
第 4 項 粉末 X 線回折	12
第 5 項 化学量論比の算出	15
第 6 項 γ -CyD polypseudorotaxanes の構造解析	17
第 7 項 PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の推定構造	21
第 4 節 CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動	22
第 1 項 各種 CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動	22
第 2 項 CyD polypseudorotaxanes の PEG 化インスリンの放出挙動に およぼす溶出溶媒量および溶媒中 CyD 濃度の影響	22
第 3 項 CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動に およぼす PEG 導入数の影響	25
第 4 項 CyD polypseudorotaxanes から放出後の PEG 化インスリンの高次構造	26
第 5 節 CyD polypseudorotaxanes のラット皮下投与後の PEG 化インスリンの 吸収挙動および血糖降下作用	28
第 1 項 CyD polypseudorotaxanes 皮下投与後の血漿中 PEG 化インスリン 濃度および血糖降下作用	28
第 2 項 インスリンの血糖降下作用におよぼす遊離 CyD の影響	33
第 3 項 PEG 化インスリンの酵素安定性におよぼす γ -CyD polypseudorotaxanes 化の影響	37

第 6 節	市販の持続性インスリン製剤と γ -CyD polypseudorotaxanes の血糖降下作用の比較	39
第 7 節	小括	40
第 2 章	PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の調製および 持続性製剤としての有用性評価	42
第 1 節	序	42
第 2 節	PEG 化リゾチームの調製と構造	43
第 1 項	PEG 化リゾチームの調製	43
第 2 項	PEG 化リゾチームの置換度と分子量測定	44
第 3 節	PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の調製と構造	45
第 1 項	PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の調製	45
第 2 項	沈殿物形成の肉眼的観察	46
第 3 項	PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes 形成時の CyDs 濃度の影響	46
第 4 項	粉末 X 線回折	47
第 5 項	化学量論比の算出	49
第 6 項	PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の推定構造	52
第 4 節	CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出挙動	53
第 5 節	CyD polypseudorotaxanes から放出後の PEG 化リゾチームの酵素活性	54
第 6 節	小括	56
総括		58
謝辞		63
実験の部		64
参考文献		69

緒言

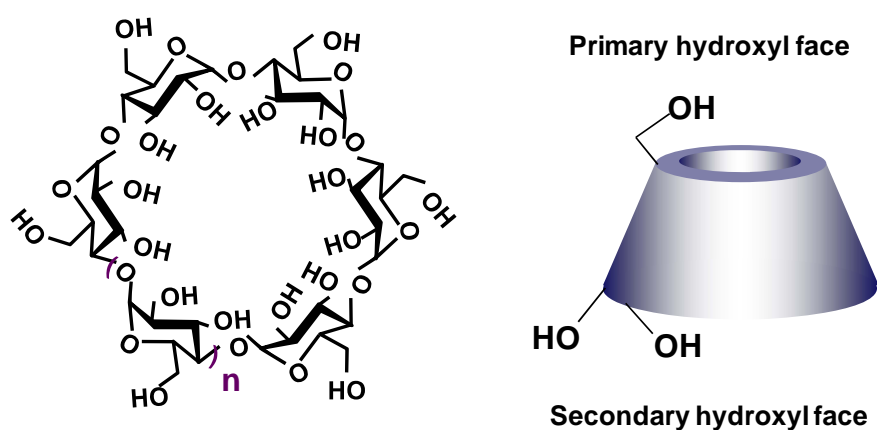
近年の遺伝子工学や細胞培養技術の目覚ましい進歩は、生体の恒常性を維持・形成する数多くのタンパク質性薬物の量産化を可能にし、臨床応用への道を大きく開いた。^{1, 2)} これらタンパク質性薬物は微量で高活性を示し、優れた医薬品として臨床で汎用される一方、1) 化学的・物理化学的に不安定で膜透過性に乏しいため、製剤化に工夫を要する、2) 免疫原性を示し、抗原となったタンパク質性薬物の効力が低下するだけでなく、反復投与によりアナフィラキシーショックなど重篤な免疫学的副作用を惹起する可能性がある、3) 血中滞留性が低く、バイオアベイラビリティが小さい、など種々の問題点を有している。³⁾ さらに、タンパク質性薬物はその用途に応じて速効化または持続化が望まれるものもある。⁴⁾ このような課題を克服するため、界面活性剤や糖類などの添加剤の使用、⁵⁾ 部位特異的変異法、⁶⁾ マイクロスフェアやリポソームなどの高分子キャリアを用いる方法⁷⁾ などが検討されている。また、最近では、ポリエチレングリコール (以下 PEG と略記する)、セルロース系あるいはアクリル系高分子を用いた化学修飾法が活発に行われている。⁸⁻¹⁰⁾ 中でも PEG は生体適合性に優れており、タンパク質を PEG 化すると化学的・物理化学的安定性、溶解性、免疫原性、血中滞留性などが改善されることから、PEG をランダムあるいは選択的に結合させた PEG 化タンパク質製剤が市販されている (Table 1)。¹¹⁾ 例えば、アデノシンデアミナーゼを PEG 化すると免疫原性が著しく低下し、血中滞留性も増大する。¹²⁾ また、ヒトインターフェロン α -2a の血中半減期は 3~8 時間であるが、PEG 化すると 72~96 時間に延長し、週 1 回の投与が可能となる。¹³⁾ このように、PEG 化はタンパク質性薬物の様々な問題点を解決する有用な手段の 1 つとして最近注目されている。

環状マルトオリゴ糖であるシクロデキストリン (以下 CyD と略記する) は分子内に疎水性の空洞を有し、空洞径に応じて種々のゲスト分子を取り込んで包接複合体を形成することが知られている (Fig. 1)。¹⁴⁾ CyD の超分子的な包接特性は、食品、化粧品、臨床検査試薬、繊維、樹脂などの多方面で利用されており、薬剤学・製剤学領域では、医薬品の安定化、溶解性や放出性の制御、バイオアベイラビリティの向上、局所刺激性の軽減、油状あるいは低融点物質の粉体化、揮発性の防止などに有効利用されている。¹⁵⁻¹⁸⁾ 最近ではその包接対象が疎水性の低分子薬物から生理活性ペプチド類や合成高分子などへと広がっ

ており、当研究室でも、CyD が遺伝子組換えヒト成長ホルモンやニワトリ卵白リゾチームなどのタンパク質性薬物と包接複合体を形成し、その化学的・物理的・化学的安定性を顕著に改善することを報告した。^{19, 20)}

Table 1. Examples of Approved PEGylated Protein Drugs ¹¹⁾

PEG conjugate	Type of PEGylation	Year to market	Disease
PEG-adenosine deaminase (Adagen [®])	Random, linear PEG	1990	Severe combined immunodeficiency
PEG-asparaginase (Oncaspar [®])	Random, linear PEG	1994	Acute lymphoblastic leukemia
PEG-interferon α -2a (PEG-intron [®])	Random, linear PEG 12 kDa	2000	Hepatitis C
PEG-growth hormone receptor antagonist (Pegvisomant, Somavert [®])	Random, linear PEG 5 kDa	2002	Acromegaly
PEG-G-CSF (Pegfilgrastim, Neulasta [®])	Selective, linear PEG 20 kDa	2002	Neutropenia during cancer chemotherapy
PEG-interferon α -2a (Pegasys [®])	Random, branched PEG 40 kDa	2002	Hepatitis C



CyD	Molecular weight	Cavity diameter (Å)	Volume of cavity (Å ³)	Solubility ¹⁾ (% w/v)
α -CyD n = 1	972	4.7 ~ 5.3	~ 174	14.5
β -CyD n = 2	1135	6.0 ~ 6.5	~ 262	1.85
γ -CyD n = 3	1297	7.5 ~ 8.3	~ 427	23.2

1) In water at 25°C.

Fig. 1. Structures and Properties of Natural Cyclodextrins

一方、本研究で対象とした PEG は CyD と包接複合体を形成することが知られている。例えば、Harada らは、 α -CyD が PEG と結晶性の包接複合体 polypseudorotaxane を形成すること (Fig. 2)、^{21, 22)} polypseudorotaxane の PEG 鎖末端に嵩高い置換基を導入すると複数の CyD をトラップした polyrotaxane を形成すること、²³⁾ さらに、空洞径が大きい γ -CyD は 2 本の PEG 鎖を包接した polypseudorotaxane を形成すること (Fig. 2)、²⁴⁾ などを明らかにした。その後、Table 2 に示すように、PEG 以外の様々なポリマーも CyDs と polypseudorotaxanes あるいは polyrotaxanes を形成することが明らかとなった。²⁵⁻²⁸⁾ これら超分子集合体は分子ネックレスとも呼ばれ、構造がユニークであるだけでなく、ホスト-ゲスト間の弱い相互作用を通して様々な機能を発現する。例えば、ポリマー鎖に沿

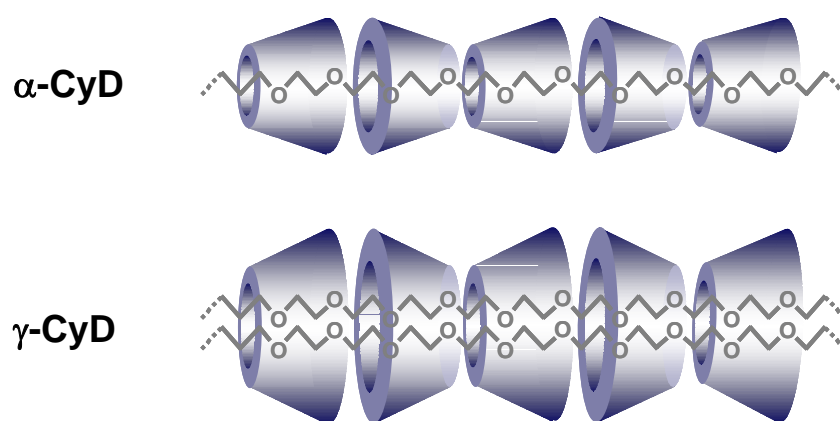


Fig. 2. Structures of PEG/ α -CyD and γ -CyD Polypseudorotaxanes

Table 2. Formation of Polypseudorotaxanes between CyDs and Polymers ²⁷⁾

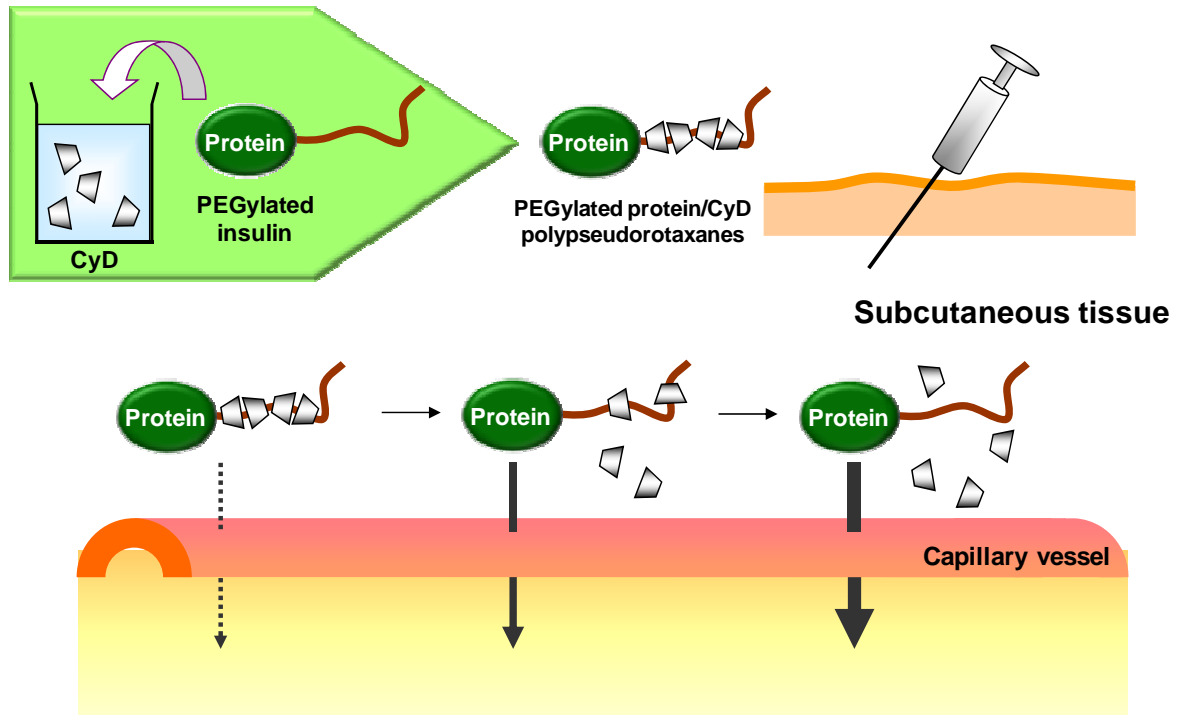
Polymer	Structure	Yield (%)		
		α -CyD	β -CyD	γ -CyD
Polyethylene glycol (M.W. 1000)	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$	92	0	66 ¹⁾
Polypropylene glycol (M.W. 1000)	$-(\text{CH}_2\underset{\text{CH}_3}{\text{CHO}})_n-$	0	96	80
Polymethyl vinyl ether (M.W. 20000)	$-(\text{CH}_2\underset{\text{O-CH}_3}{\text{CH}})_n-$	0	0	80

1) The value was calculated using data of Ref. 28.

ってモバイリング可能な CyD を利用した分子情報プロセッシング、分子素子、分子マシーン (分子シャトル)、polyrotaxane 中の CyD を架橋した分子チューブ、polyrotaxane 中の CyD の滑車効果を利用したトポロジカルゲルなどの検討が活発に行われている。²⁹⁻³³⁾ 医薬分野においても、polypseudorotaxane や polyrotaxane 中の CyD 分子にガラクトースやマルトースなどのレセプター認識糖を結合させ、リガンドがモバイリングしながらレクチンと多価相互作用するレクチン阻害剤、PEG/CyD polypseudorotaxane 形成を利用したハイドルゲル、あるいは polyrotaxane 中の CyD にアミノ基を導入し、DNA とポリプレックスを形成する新規遺伝子導入用ベクターなどの検討が行われている。³⁴⁻⁴¹⁾

一方、前述のように、様々な PEG 化タンパク質性医薬品が開発されているものの、それらの polypseudorotaxane 形成および医薬への応用に関する報告は皆無である。PEG 化タンパク質を CyDs で polypseudorotaxane 化すると、溶解性や体内動態などの物理化学的および生物薬剤学的性質はタンパク質単独や PEG 化タンパク質と異なることが予想される。このような背景のもと、本研究では PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxane の調製とそれらの製剤への応用に関する検討を企図した。すなわち、CyD polypseudorotaxane が難水溶性であることに着目して、CyD polypseudorotaxane 化により PEG 化タンパク質の溶解性を制御し、持続性に優れるタンパク質製剤の構築を目指した。Scheme 1 は、PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxane を皮下投与後の薬物放出挙動の予想図を示す。PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxane は皮下組織内で希釈され、PEG 化タンパク質を徐々に放出し、持続効果を示すことが期待される。そこで、第 1 章では、ウシ膵臓由来インスリンを用いて、PEG 化インスリンおよびそれらの CyD polypseudorotaxane を調製し、polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出挙動を *in vitro* および *in vivo* において検討した。第 2 章では、ニワトリ卵白リゾチームの PEG 化、それらの CyD polypseudorotaxane の調製および polypseudorotaxane からの PEG 化リゾチームの放出挙動を検討するとともに、放出後の PEG 化リゾチームの *in vitro* 酵素活性を検討した。

以下に本研究で得られた知見を詳述する。



Scheme 1. Proposed Scheme for Release of PEGylated Proteins from CyD Polypseudorotaxanes

結果と考察

第 1 章 PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の調製および持続性製剤としての応用

第 1 節 序

インスリンは、1921 年 Banting と Best によってイヌ膵臓から初めて抽出された分子量約 6000、等電点 5.1-5.3 の 2 本鎖から成るポリペプチドであり、⁴²⁾ 代表的な糖尿病治療薬である (Fig. 3)。最近では糖尿病発症早期から厳密かつ生理的に血糖コントロールを行う強化インスリン療法が奨励され、十分量の速効型インスリンを毎食前に投与し、食後の高血糖を制御することによって、内因性インスリンの基礎分泌を促し、肝臓でのインスリン抵抗性の獲得を回避する療法が主流となっている。⁴³⁾ 一方、持続型あるいは中間型インスリン製剤の開発により基礎インスリン分泌の補充療法が行われるようになった。基礎インスリン補充の目的は血漿中インスリン濃度を狭い範囲に維持することにあるが、従来の持続性製剤ではインスリンの基礎分泌を必ずしも代替できないため、特にインスリン依存型糖尿病患者の血糖値の管理が困難な場合がある。そこで、吸収・薬効のバラツキが少ない持続型インスリン製剤の開発が望まれており、⁴⁴⁾ 数多くの研究が行われている。例えば、Mark らは脂肪酸修飾インスリンと native インスリンの共結晶を調製し、効果を安定に 24

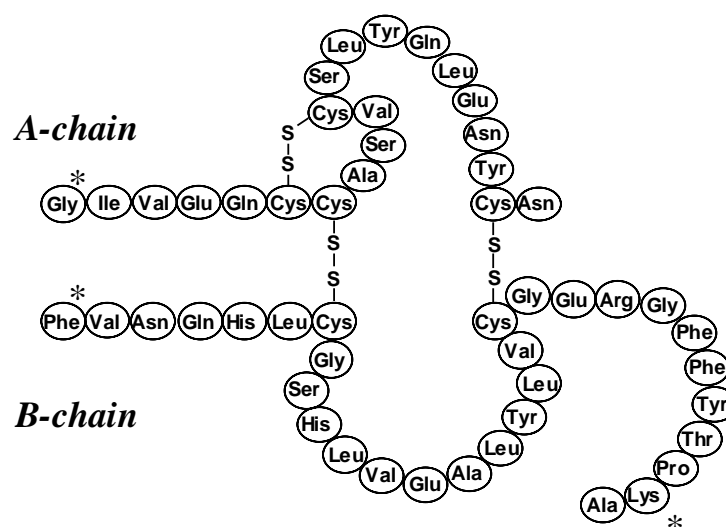


Fig. 3. Structure of Bovine Insulin

* Possible PEGylation moiety.

時間持続させることに成功した。⁴⁵⁾ また、Kenneth らは PEG 化インスリンを PLGA マイクロスフェアに封入し、効果を 9 日間持続させることを報告した。⁴⁶⁾

そこで本章では、分子内に 1 本の PEG 鎖を導入した PEG 化インスリンおよびそれらの CyD polypseudorotaxanes を調製し、持続性製剤としての有用性の評価を *in vitro* および *in vivo* において行った。

第 2 節 PEG 化インスリンの調製と構造

インスリンは代表的なタンパク質性薬物の一つであり、数多くの化学修飾が行われている。例えば、Miroslav らは、カルボキシメチルデキストランとインスリンの結合体を調製し、物理的安定性を顕著に改善した。⁹⁾ Lee らは胆汁酸とインスリンの結合体を調製し、効果の持続化に成功した。⁴⁷⁾ また、Kim らはインスリンのアミノ酸残基を選択的に PEG 化することに成功し、その物理的安定性を向上させた。^{48, 49)} そこで本節では、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxane 調製の前段階として、平均分子量 2000 の PEG 鎖を 1 本導入した PEG 化インスリンを調製し、MALDI-TOF Mass スペクトルおよび HPLC により確認した。

インスリンは分子内に A 鎖 1 位のグリシン ($pK_a \approx 8.0$)、B 鎖 1 位のフェニルアラニン ($pK_a < 7.0$)、B 鎖 29 位のリジン ($pK_a \approx 10.5$) と 3 個の 1 級アミノ基を有し、反応溶液の pH を調節することにより、各アミノ基の反応性を制御することができる。⁴⁷⁾ 例えば、pH 10 以上では B 鎖 29 位のリジンと求電子性物質が選択的に反応するため、B 鎖 29 位のリジンを標的とした化学修飾が一般的に行われている。

Fig. 4 は PEG 化インスリンの合成経路を示す。Lee らの方法⁴⁷⁾ に従い、 α -Succinimidylloxysuccinyl- ω -methoxy-polyoxyethylene (mPEG-OSu) を pH 10 の DMF/水混合溶液中でウシ膵臓由来インスリン (以下インスリンと略記する) のアミノ基と反応させ、透析 (Spectra/Por[®] Membrane MWCO: 3500) および HPLC により精製した。なお、調製物中に未反応の PEG が残存していないことは TLC および FAB Mass スペクトル分析により確認した。

Fig. 5a は PEG 化インスリンの MALDI-TOF Mass スペクトルを示す。質量数 (m/z)

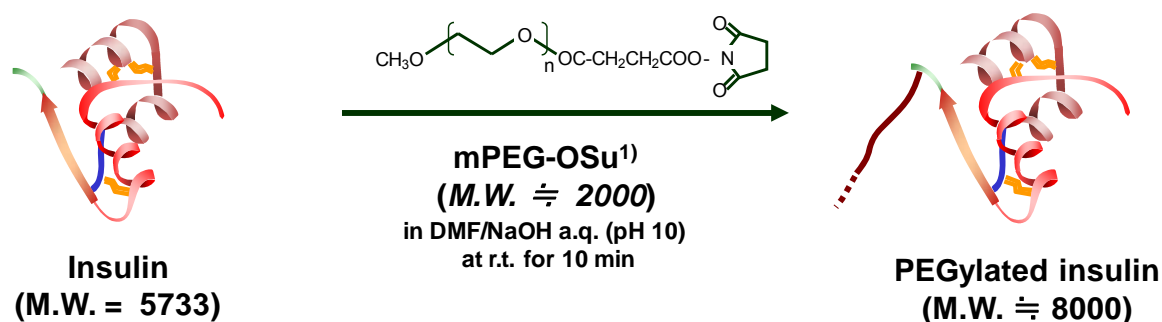


Fig. 4. Preparation of PEGylated Insulin

1) α -Succinimidyl- ω -methoxy-polyoxyethylene.

8000 付近に分散したピークを与え、この値はインスリンと PEG が 1:1 で結合した PEG 化インスリンの分子量と一致した。さらに、分散したピーク間隔は PEG のエチレングリコールユニットの分子量である 44 と一致することから、生成物は PEG 鎖が 1 本導入された PEG 化インスリンであることを確認した。また、Fig. 5b は PEG 化インスリンの HPLC チャートを示す。インスリン単独は保持時間 12.4 分に鋭い 1 本のピークを与えたのに対し、PEG 化インスリンは保持時間 15.4 分にブロードな 1 本のピークを与えた。ピーク強度から推定した PEG 化インスリンの純度は 99% 以上であった。

以上の結果より、本条件下で調製した PEG 化インスリンは、平均分子量約 2000 の PEG が 1 本導入された PEG 化インスリンであることが確認された。

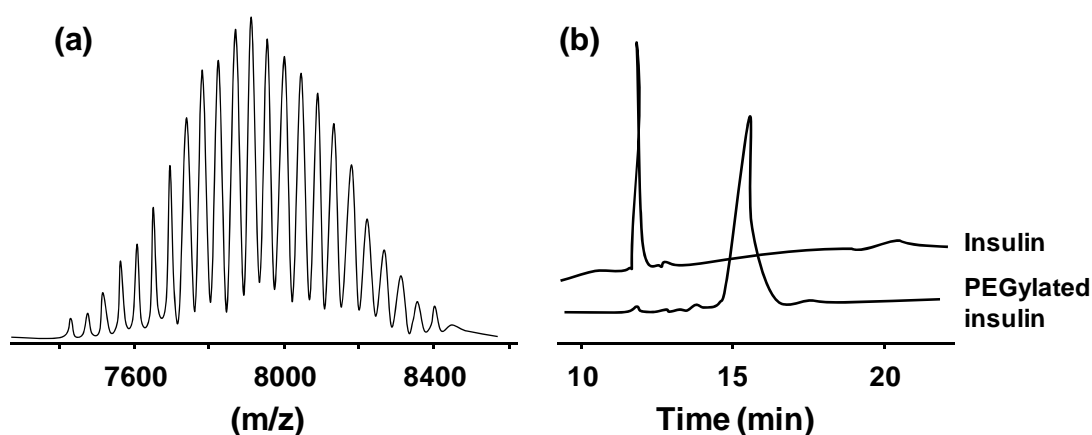


Fig. 5. MALDI-TOF Mass Spectrum (a) and HPLC Chromatograms¹⁾ (b) of PEGylated Insulin

1) Solvent A, 0.1% trifluoroacetic acid in 30% acetonitrile ; solvent B, 0.1% trifluoroacetic acid in 95% acetonitrile. HPLC was conducted in linear gradient of 0% to 100% of solution B over 60 min, at a flow rate of 1.0 mL/min, using a C18 (4.6 x 150 mm) column. The effluent was monitored by UV at 280 nm.

第 3 節 PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の調製と構造

Polypseudorotaxane や polyrotaxane は難水溶性であるため医薬分野への応用は困難であったが、最近 polypseudorotaxane 中の CyDs に様々な置換基を導入した水溶性誘導体が開発され、医薬分野への応用が盛んに行われている。⁵⁰⁻⁵⁵⁾ 例えば、Yui らは生体内分解性 polyrotaxane の CyD をヒドロキシプロピル化し、さらにインスリンを結合させて物理的安定性を向上させている。⁵⁶⁾ また、polyrotaxane 中の CyD の水酸基をカルボキシエチルエステル化したアニオン性 polyrotaxane はトリプシンの酵素活性を顕著に阻害することが報告されている。⁵⁷⁾ しかしながら、polypseudorotaxane や polyrotaxane を持続性製剤に応用した例や PEG 化タンパク質を polypseudorotaxane にした研究はほとんど行われていない。そこで本節では、前節で示した PEG 化インスリンと CyD との polypseudorotaxane を調製し、polypseudorotaxane 化による沈殿物形成を肉眼的に観察した。さらに、FT-IR スペクトル、粉末 X 線回折および ¹H-NMR スペクトルによりそれらの構造を推定した。また、polypseudorotaxane のホスト-ゲスト化学量論比、end-capped PEG 誘導体/CyD polypseudorotaxane の形成、PEG/ γ -CyD polypseudorotaxanes の収率におよぼす PEG 分子量および γ -CyD 添加量の影響について検討を行った。

第 1 項 PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の調製

Fig. 6 は PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxane の調製法を示す。Harada らの方法²¹⁾に従い、高濃度の CyDs 水溶液に PEG 化インスリン水溶液を添加し、12 時間静置することにより調製した。なお、polypseudorotaxane は低温で形成されやすいことや、⁵⁸⁾インスリンの安定性を考慮して、調製は 4°C で行った。

第 2 項 沈殿物形成の肉眼的観察

Polypseudorotaxane は、隣接する CyD 同士で水素結合を形成し、水分子と水素結合ができなくなるため、難水溶性となる。^{27, 33)} Fig. 7 は PEG 化インスリン/CyD

polypseudorotaxanes 形成の確認として、反応終了時の水溶液を肉眼的に観察した結果を示す。 α - および γ -CyD 水溶液に非 PEG 化インスリンを添加した系や β -CyD 水溶液に PEG 化インスリンを添加した系では沈殿物は形成されなかったが、 α - および γ -CyD 水溶液に PEG 化インスリンを添加すると、白色沈殿物の形成が観察された。 PEG 単独の場合も同様の沈殿物を形成することから、これら PEG 化インスリン中の PEG 鎖は α - および γ -CyD と polypseudorotaxane を形成することが示唆された。

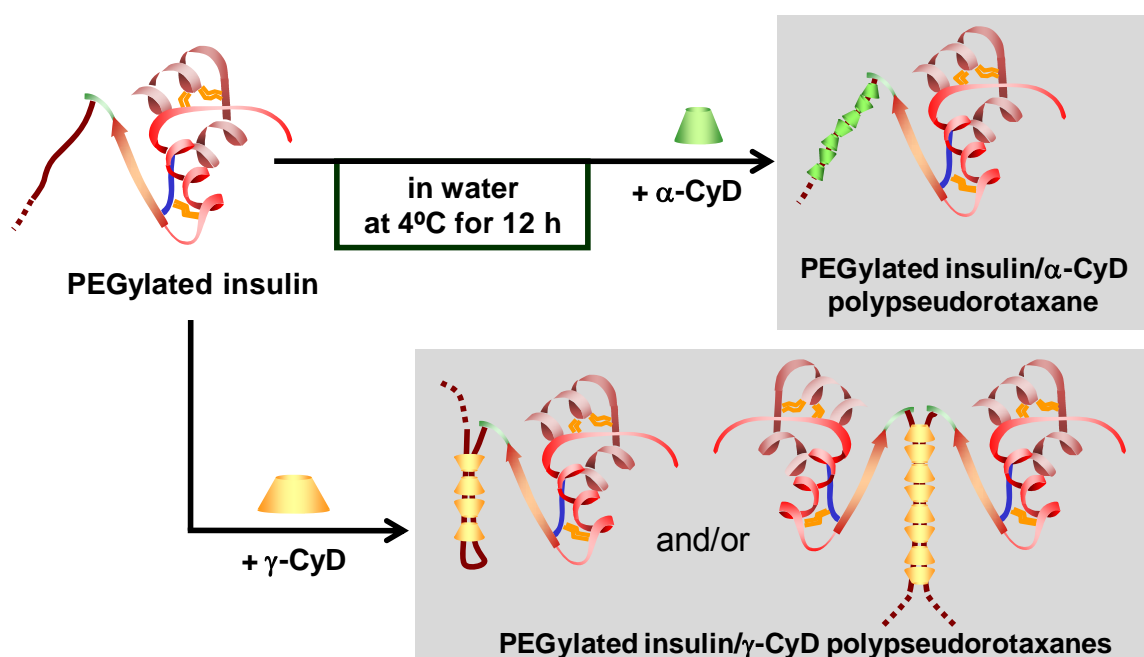


Fig. 6. Preparation of PEGylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes

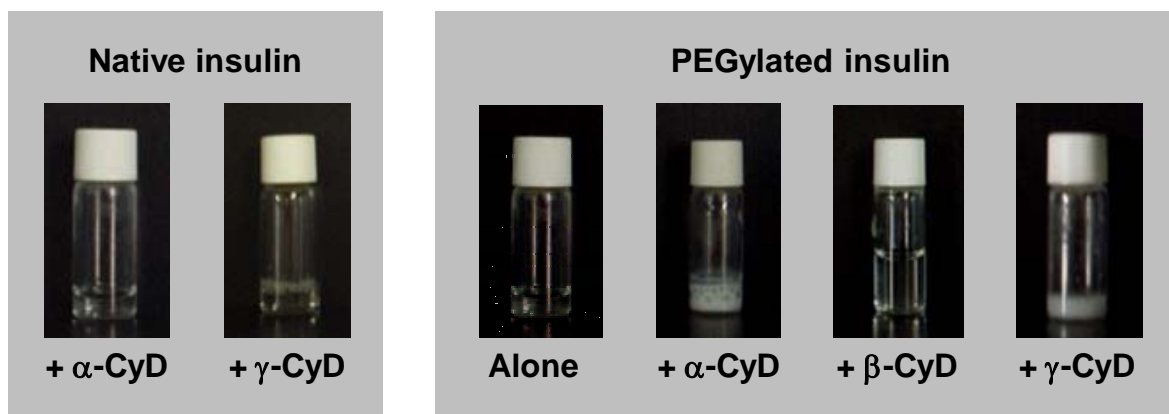


Fig. 7. Photographs of PEGylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes

第 3 項 FT-IR スペクトル

Fig. 8 は PEG 化インスリン/ α - および γ -CyD polypseudorotaxane 沈殿物の FT-IR スペクトルを示す。 α -CyD 系において、 α -CyD 単独は 3359 cm^{-1} を中心として $4000 \sim 3200\text{ cm}^{-1}$ 間に O-H 基伸縮振動に基づくブロードなピークを与えた。一方、PEG 化インスリン/ α -CyD polypseudorotaxane は 3398 cm^{-1} にピークを与え、 α -CyD 単独や物理的混合物 (3322 cm^{-1}) に比べて高波数シフトした。また、 γ -CyD 系においても同様に、polypseudorotaxane における O-H 基伸縮振動に基づくピーク (3402 cm^{-1}) は、 γ -CyD 単独 (3359 cm^{-1}) や物理的混合物 (3323 cm^{-1}) に比べて高波数シフトした。これは、CyD polypseudorotaxanes 形成により、隣接する CyD の OH 基同士が水素結合を形成したことによるものと考えられる。^{59, 60} 以上の結果より、Fig. 7 における沈殿物は CyD polypseudorotaxanes 由来のものであることが示唆された。

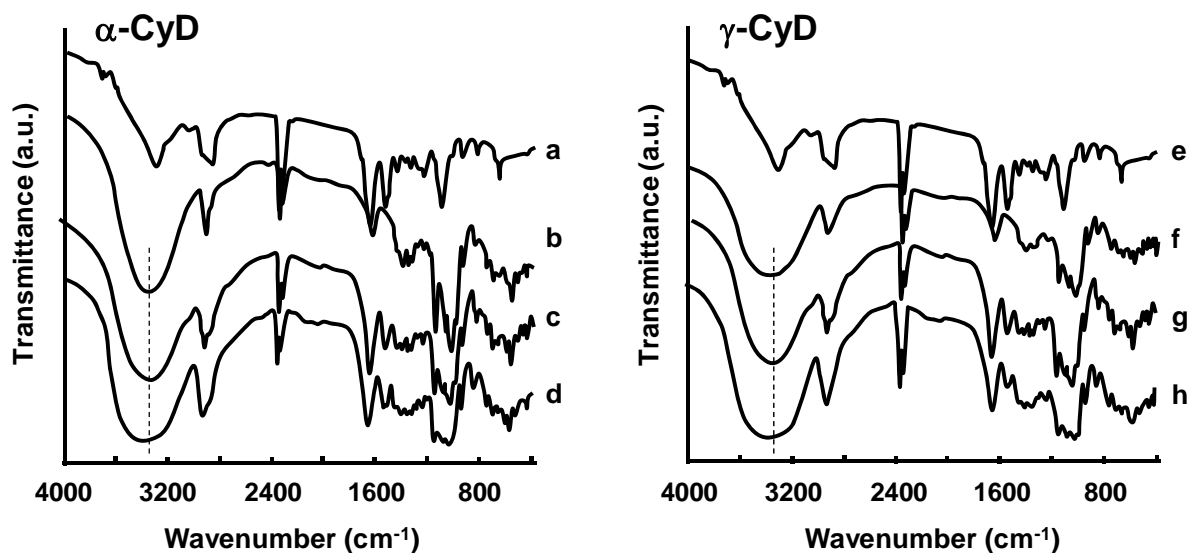


Fig. 8. FT-IR Spectra of PEGylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes

- | | |
|--|--|
| a) PEGylated insulin | e) PEGylated insulin |
| b) α -CyD | f) γ -CyD |
| c) PEGylated insulin/ α -CyD physical mixture | g) PEGylated insulin/ γ -CyD physical mixture |
| d) PEGylated insulin/ α -CyD polypseudorotaxane | h) PEGylated insulin/ γ -CyD polypseudorotaxane |

第 4 項 粉末 X 線回折

CyD 複合体の結晶構造は主にかご型、層状および筒型構造に分類される (Fig. 9)。⁶¹⁾ Polypseudorotaxane 中の CyD は筒型に配列しているため、その粉末 X 線回折パターンは CyD 単独や PEG/CyD 物理的混合物と異なることが知られている。⁶²⁾

Fig. 10 は PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の粉末 X 線回折図を示す。 α -CyD 系において、PEG 化インスリンとの物理的混合物は α -CyD 単独と同様にかご型構造の回折パターンを示した。一方、PEG 化インスリン/ α -CyD polypseudorotaxane は、 $2\theta = 7.48^\circ$ 、 12.8° 、 19.8° および 22.5° に特徴的なピークを与え、PEG/ α -CyD polypseudorotaxane の回折パターンと同様に六方晶系筒型構造 (Fig. 11a) の回折パターンを示した。⁶³⁻⁶⁶⁾ また、 γ -CyD 系においても同様に、 γ -CyD 単独や PEG 化インスリンとの物理的混合物はかご型構造の回折パターンを示した。一方、PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane は、 $2\theta = 7.36^\circ$ 、 14.8° 、 15.6° 、 16.6° および 21.7° に特徴的なピークを与え、PEG/ γ -CyD polypseudorotaxane と同様に立方晶系筒型構造 (Fig. 11b) の回折パターンを示した。⁶³⁻⁶⁶⁾ これらの結果は、 α - および γ -CyD が PEG 化インスリン中の PEG 鎖を優位に包接し、筒型構造の複合体、すなわち polypseudorotaxane を形成することを強く示唆する。

さらに結晶内充填様式の詳細を明らかにするため、 α - および γ -CyD polypseudorotaxanes の回折パターンをそれぞれ六方晶系および立方晶系と仮定し、Takeo らの方法^{63,64)} に準じて、各回折線の指数配当を行った。まず、観測された粉末 X 線回折図をもとに、Bragg の式 (式 (1)) を用いて、各面指数 (hkl) で与えられる格子面間隔 d_{obs} を算出した。次に、 α -CyD polypseudorotaxane の場合は六方晶系をあらわす式 (2)、 γ -CyD polypseudorotaxanes の場合は立方晶系をあらわす式 (3) を用いて、各 (200) 回折線の d_{obs} から a 軸および b 軸を決定したところ、それぞれ、 $a = b = 27.29 \text{ \AA}$ および $a = b = 24.02 \text{ \AA}$ と算出された。これらの値を用いて、式 (2) および式 (3) から格子面間隔の計算値 d_{cal} を算出した。Table 3 は、上記方法により PEG 化インスリン/ α - および γ -CyD polypseudorotaxanes の回折線の指数配当を行った結果を示す。いずれの系においても、全ての面指数 (hkl) で d_{obs} と d_{cal} がよく一致したことから、 α - および γ -CyD polypseudo-

rotaxane は結晶内においてそれぞれ六方晶系および立方晶系の筒型構造を有するものと推定された (Fig. 11)。

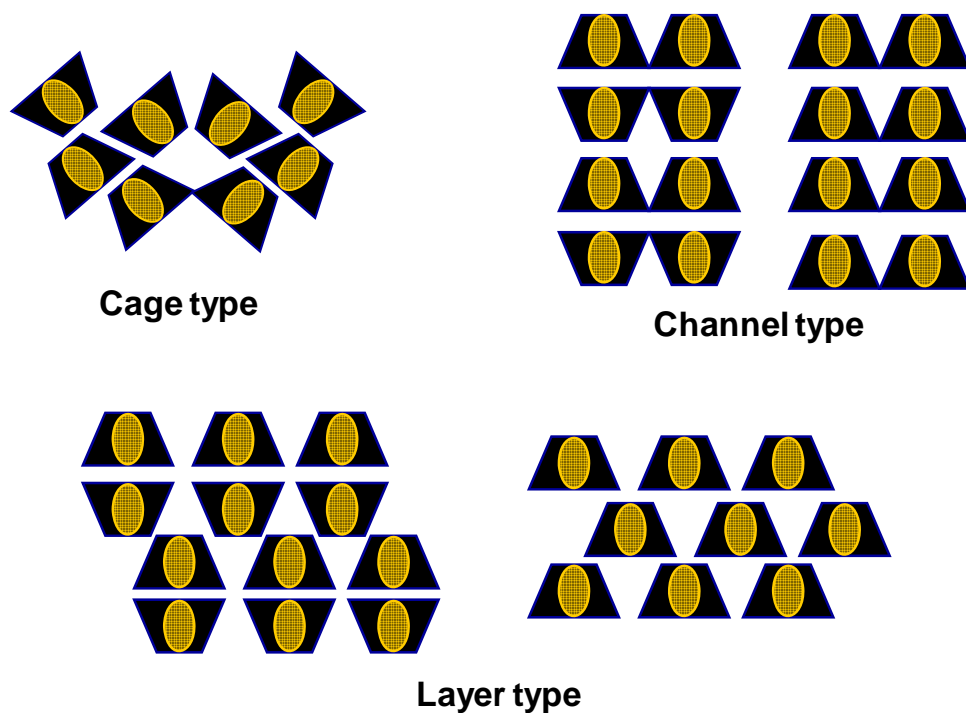


Fig. 9. Proposed Crystalline Packing Structures of CyD Inclusion Complex

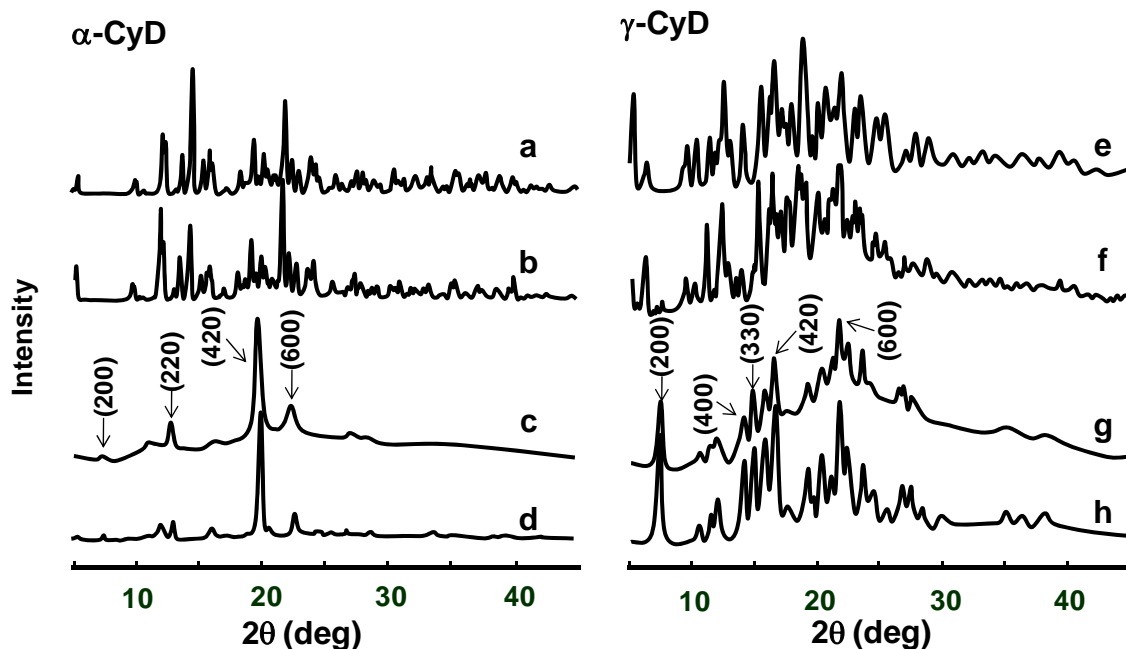


Fig. 10. Powder X-ray Diffraction Patterns of PEGylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes

- a) α -CyD
- b) PEGylated insulin/ α -CyD physical mixture
- c) PEGylated insulin/ α -CyD polypseudorotaxane
- d) PEG/ α -CyD polypseudorotaxane
- e) γ -CyD
- f) PEGylated insulin/ γ -CyD physical mixture
- g) PEGylated insulin/ γ -CyD polypseudorotaxane
- h) PEG/ γ -CyD polypseudorotaxane

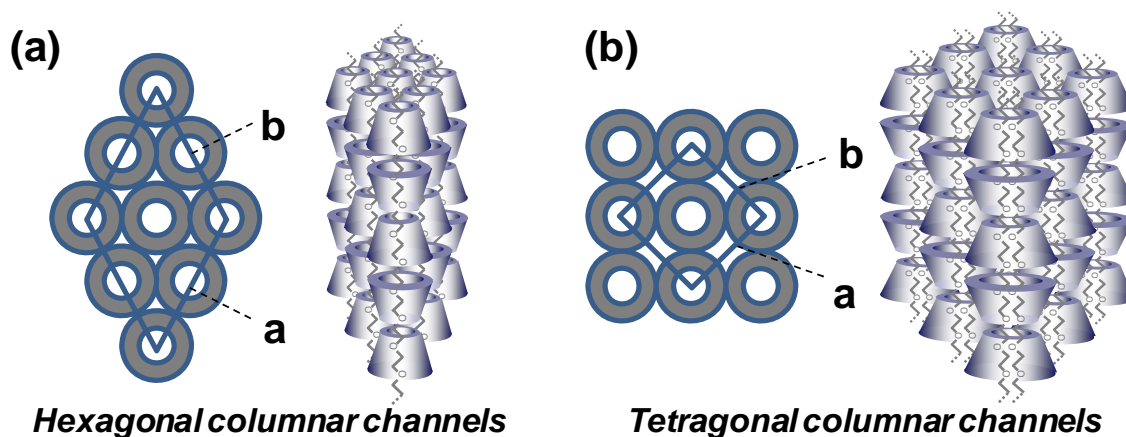


Fig. 11. Schematic Representation of Crystal Packing Structures of PEGylated Insulin/ α -CyD (a) and γ -CyD (b) Polypseudorotaxanes

$$2d \sin\theta = \lambda \quad \dots (1)$$

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{4/3 (h^2 + hk + k^2) + (l/c)^2}} \quad \dots (2)$$

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad \dots (3)$$

Table 3. Crystallographic Characteristics of PEGylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes

<i>α-CyD polypseudorotaxane</i>				<i>γ-CyD polypseudorotaxane</i>			
2 θ (deg)	(hkl)	d _{obs} (Å)	d _{cal} ¹⁾ (Å)	2 θ (deg)	(hkl)	d _{obs} (Å)	d _{cal} ²⁾ (Å)
7.48	(200)	11.82	11.82	7.36	(200)	12.01	12.01
12.84	(220)	6.89	6.82	14.78	(400)	5.99	6.01
19.78	(420)	4.48	4.47	15.60	(330)	5.68	5.66
22.48	(600)	3.95	3.94	16.58	(420)	5.35	5.37
				21.68	(600)	4.10	4.00

1) Calculated assuming a hexagonal unit cell with $a = b = 27.29$ Å, packing diameter 11.82 Å.

2) Calculated assuming a tetragonal unit cell with $a = b = 24.02$ Å, packing diameter 12.01 Å.

第 5 項 化学量論比の算出

本項では、PEG 化インスリン中の PEG 鎖 1 本に対する CyD 貫通数を求めるため、CyD/PEG 化インスリン混合比と polypseudorotaxane 収率の関係について検討した。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル法による polypseudorotaxanes の組成分析を行った。

Fig. 12 は、polypseudorotaxane 収率におよぼす CyD/PEG 化インスリン混合比 (モル比) の影響を示す。⁶⁷⁾ α -CyD 系において、polypseudorotaxane 収率は、CyD/PEG 化インスリン混合比を増加させると直線的に増大し、混合比が約 20 付近でプラトーに達した。一方、 γ -CyD は混合比約 10 付近でプラトーに達した。これらの結果は、 α - および γ -CyD が PEG 化インスリンとそれぞれモル比 20/1 および 10/1 で polypseudorotaxane を形成することを示唆する。

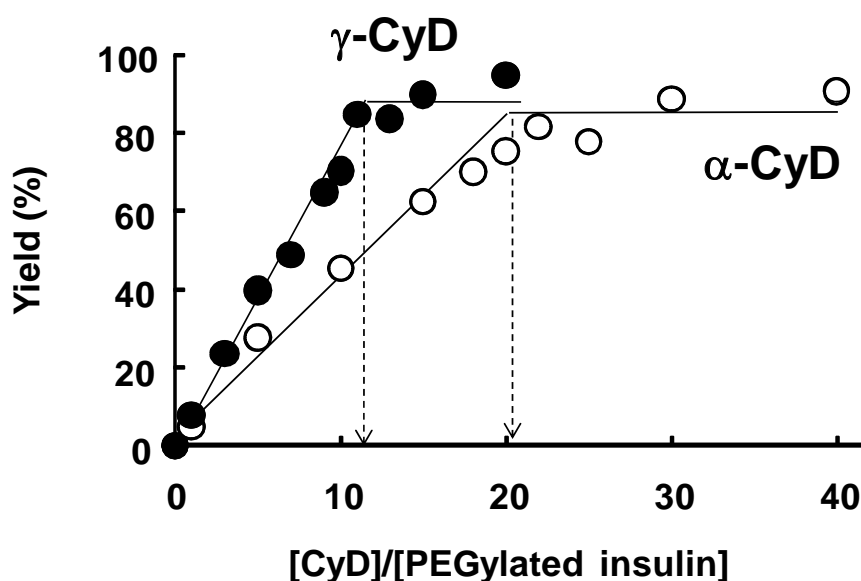


Fig. 12. Changes in Yield of PEGylated Insulin/ α -CyD (O) and γ -CyD (●) Polypseudorotaxanes as a Function of [CyD]/[PEGylated Insulin]

次に、polypseudorotaxane の化学量論比をより詳細に明らかにするため、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル法による組成分析を行った。Fig. 13 は PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxane を DMSO に溶解後の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。4.8 ppm 付近に CyD 1 位のプロトン、3.5 ppm 付近に PEG のプロトン、6.5~9.0 ppm 付近にインスリン芳香族アミノ酸残基の

プロトンピークが観察された。さらに、CyD および PEG のプロトンピークの積分値を比較した結果、PEG 化インスリン中の PEG 鎖 1 本に α - および γ -CyD はそれぞれ 20.1 個および 11.0 個貫通していることが明らかとなった (Table 4)。これらの値は、Fig. 12 の結果とよく対応する。Harada らの報告によると、CyDs の空洞の深さ (6.7 Å) は PEG のエチレングリコール単位 2 個分 (6.6 Å) に相当することから、今回用いた平均分子量約 2000 の PEG 鎖は最高 22~23 個の CyDs が貫通できる長さを有するものと推定される。²¹⁾ これらの結果より α - および γ -CyD の貫通率を算出したところ、貫通率はそれぞれ 89% および 49% であった。 γ -CyD polypseudorotaxane の貫通率および CyD 数は α -CyD polypseudorotaxane の約半分であることから、Fig. 6 に示すように、 α -CyD は PEG 化インスリンの PEG 鎖 1 本、 γ -CyD は PEG 鎖 2 本と polypseudorotaxane を形成するものと考えられる。

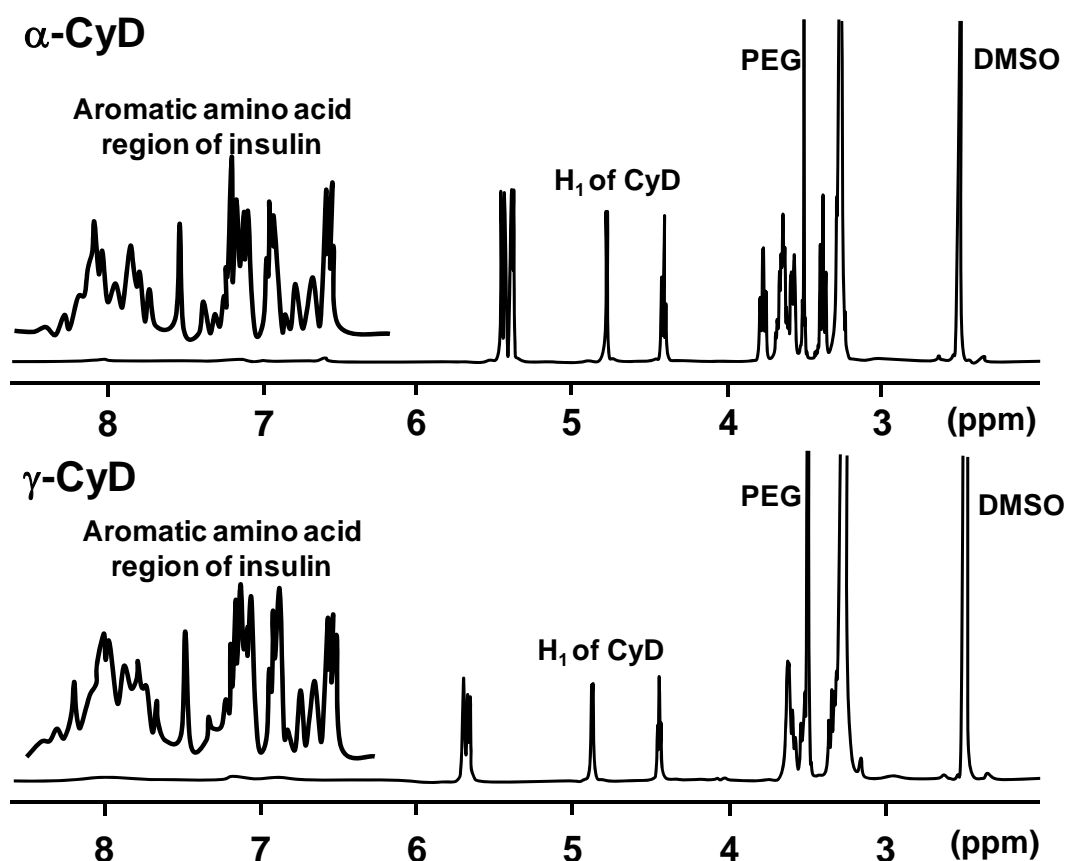


Fig. 13. ¹H-NMR Spectra of PEGylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes in DMSO-*d*₆ at 25°C

Table 4. Compositions of PEGylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes

Protein	CyD	Yield (%)	CyD _{number} ¹⁾	Coverage ²⁾ (%)
Insulin	α -CyD	81.4	20.1	89.3
	γ -CyD	84.7	11.0	49.1

1) Number of total CyD units in the polypseudorotaxane.

2) Coverage = 2 (CyD per PEG)/(PEG repeat units), assuming 2 PEG repeat units per CyD.

第 6 項 γ -CyD polypseudorotaxanes の構造解析

前項では、 γ -CyD が PEG 化インスリン中の PEG 鎖 2 本分を包接し、polypseudorotaxane を形成することが示唆された。Harada らは、 γ -CyD polypseudorotaxane には、2 分子の PEG 鎖を γ -CyD が包接する分子間 polypseudorotaxane (Fig. 14a) と 1 分子の折れ曲がった PEG 鎖を包接する分子内 polypseudorotaxane (Fig. 14b) が存在すると推定している。²⁴⁾ これまで、PEG 化フラーレン、poly (ϵ -caprolactone)、poly (ethyleneimine) などの様々なポリマーと γ -CyD との polypseudorotaxanes 形成が報告されているが、^{28, 50, 67, 68)} 個別の構造解析は行われておらず、特に、分子内 polypseudorotaxane 形成に関する詳細は不明である。そこで本項では、PEG 化インスリンと γ -CyD との分子内 polypseudorotaxane 形成を考慮した構造解析を行った。

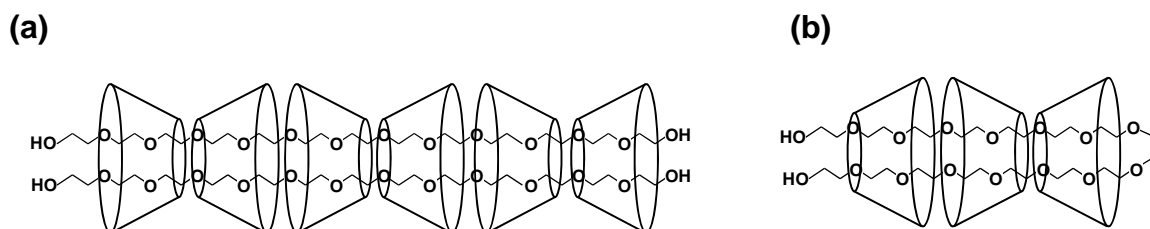


Fig. 14. Proposed Structures of Intermolecular (a) and Intramolecular (b) γ -CyD Polypseudorotaxanes with PEG

CyDs は、ポリマー鎖を貫通して polypseudorotaxane を形成するため、ポリマーの両末端に嵩高い置換基を導入すると polypseudorotaxanes を形成しない。しかし、 γ -CyD が分子内 polypseudorotaxane を形成すると仮定すると、折れ曲がったポリマー鎖の一定方向から入り込み、polypseudorotaxane を形成するものと考えられる。この仮説のもと、Fig. 15 では、PEG の両末端に Z-benzyloxycarbonyl L-phenylalanine (Zphe) を導入した誘導体 (Zphe₂-PEG) を調製し、 α - および γ -CyD との polypseudorotaxane 形成を検討した。Zphe₂-PEG は、PEG-bis amine に過剰量の succinimidyl-Z-benzyloxycarbonyl L-phenylalanine (Zphe-OSu) を DMF 中で反応させ、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧乾燥することにより調製した (Fig. 15)。なお、生成した化合物は PEG の両端が Zphe でキャップされた誘導体であること、ならびに生成物中には未反応物の PEG が残存しないことを FAB Mass スペクトルおよび TLC により確認した。Fig. 15 に示すように、Zphe₂-PEG 水溶液に α -CyD 水溶液を添加しても polypseudorotaxane の沈殿物は観察されなかった。これは、PEG 両末端に Zphe 基が存在するため、 α -CyD が PEG 鎖を貫通できないことに起因する。一方、 γ -CyD 水溶液を添加すると、速やかに白色沈殿物が析出した。 α -CyD と同様、 γ -CyD も Zphe 基を貫通するのは困難なことから、この沈殿物は分子内 polypseudorotaxane に由来するものと考えられる。これらの結果は、 γ -CyD が PEG と分子内 polypseudorotaxane を形成することを示唆する。

γ -CyD が PEG と分子間 polypseudorotaxane を形成する際には、2 本の PEG 鎖が接近する必要がある。すなわち、polypseudorotaxane 調製時において、PEG を大過剰量の γ -CyD 水溶液内に添加すると PEG 濃度が低下し、PEG 2 分子の接近は困難となるため、分子間 polypseudorotaxane の形成には不利になるものと考えられる (Fig. 16 上段参照)。そこで Fig. 16 では、一定量 (20 mg) の PEG (M.W. = 2000) に対して、232 mg/mL の γ -CyD 水溶液を 0.7 mL (通常量) あるいは 7 mL (大過剰量) 添加し、生成した polypseudorotaxane の収率を比較検討した。また、PEG 鎖の折れ曲りが困難で、分子内 polypseudorotaxane の形成が不利になる短鎖 PEG (M.W. = 400) を用いて同様の検討を行った。Fig. 16A に示すように、 γ -CyD 水溶液 7 mL に PEG (M.W. = 2000) を添加した系では、polypseudorotaxane 形成の収率は 97% であり、 γ -CyD 水溶液 0.7 mL 添加系に比べて収率の減少は認められなかった。これは、大過剰量の γ -CyD 水溶液中

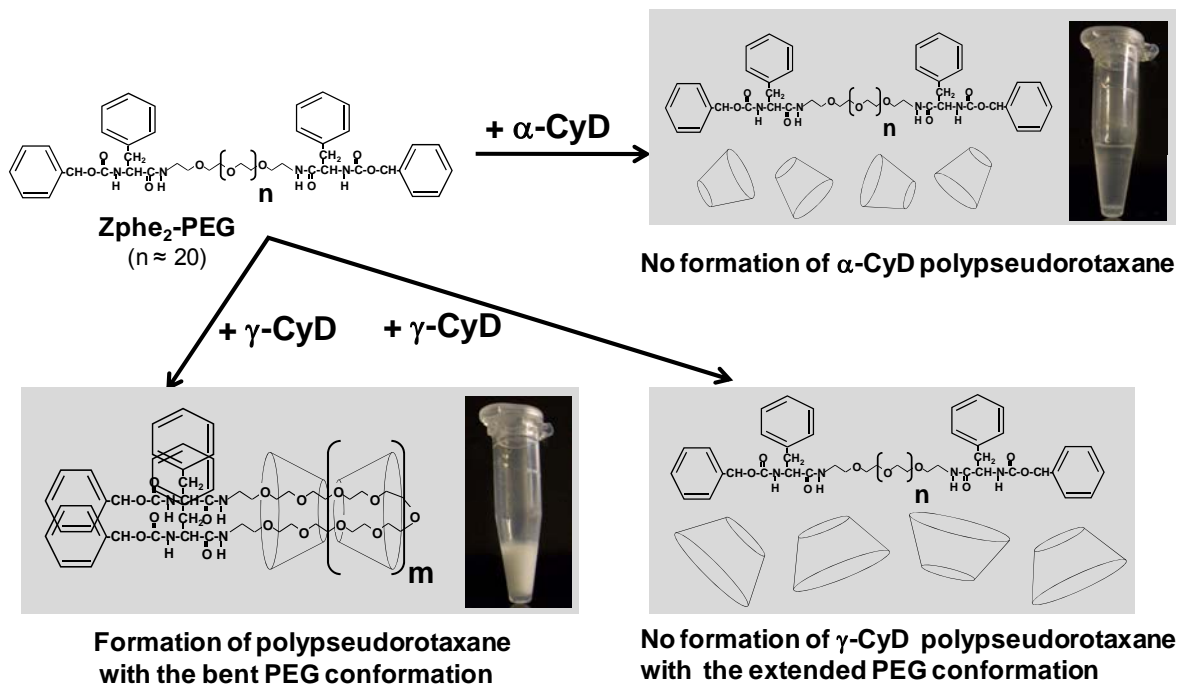


Fig. 15. Macroscopic Photographs of Precipitates of Zphe₂-PEG/CyD Polypseudorotaxanes and Their Interaction Modes

で 2 分子の PEG が接近できず、分子間 polypseudorotaxane の形成が困難であるにも関わらず、PEG (M.W. = 2000) が分子内 polypseudorotaxane を形成するため、収率は影響を受けなかったものと考えられる。一方、短鎖 PEG (M.W. = 400) を γ -CyD 水溶液 7 mL に添加した系では polypseudorotaxane の収率は 24% であり、0.7 mL 添加系 (収率 44%) に比べて著しい収率の減少が観察された (Fig. 16B)。これは、大過剰量の γ -CyD 水溶液では 2 分子の PEG が接近できず、分子間 polypseudorotaxane を形成できなかったことに加え、短鎖 PEG (M.W. = 400) は折れ曲がれず、分子内 polypseudorotaxane を形成できないことに起因するものと考えられる。 Fig. 15 および Fig. 16 の結果より、PEG (M.W. = 2000) は γ -CyD と分子内 polypseudorotaxane を形成することが示唆された。以上の結果より、長鎖 PEG は 2 本の PEG 分子が平行に並んで γ -CyD 空洞に包接された分子間 polypseudorotaxane ならびに 1 本の PEG 分子が折れ曲がって包接された分子内 polypseudorotaxane の構造異性体が存在するものと推定された。一方、 α -CyD は 1 本の PEG 分子と polypseudorotaxane を形成することが確認された。

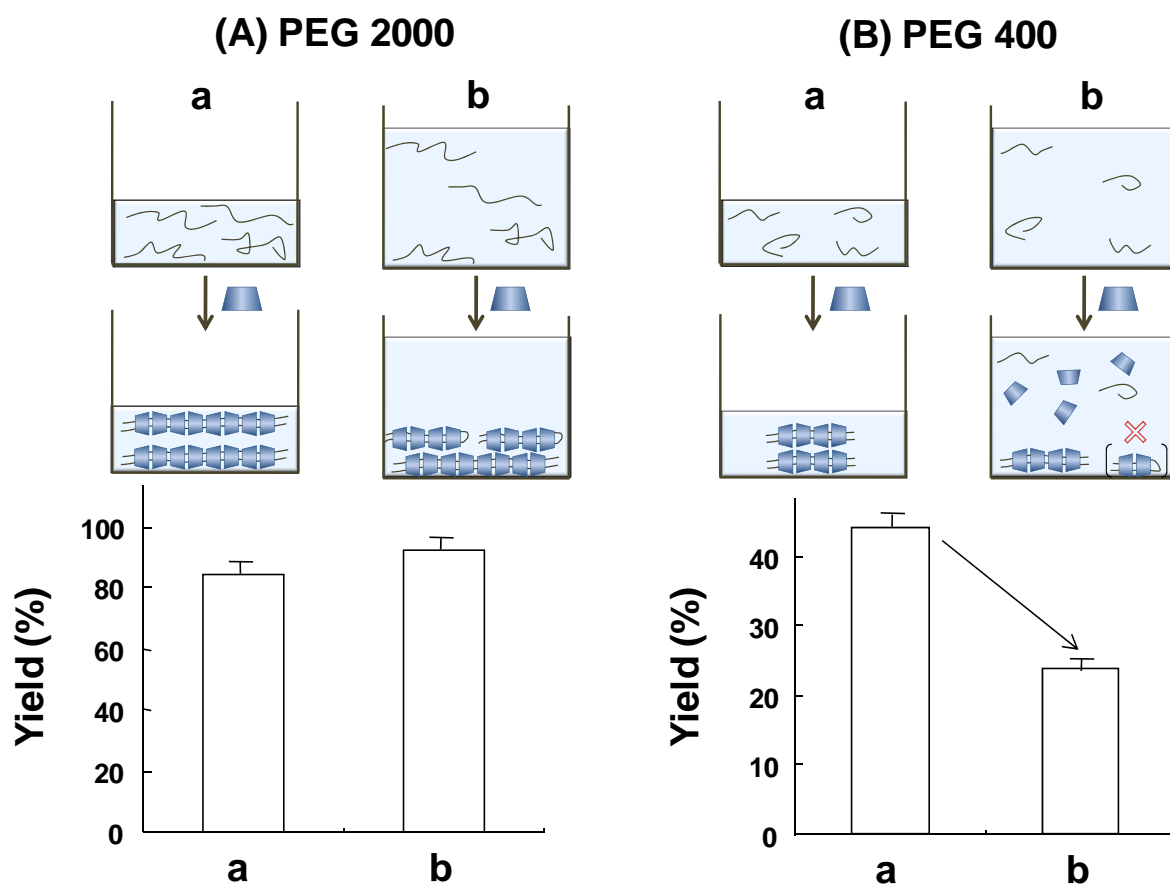


Fig. 16. Changes in Yield of PEG/ γ -CyD Polypseudorotaxanes in Different Volumes of γ -CyD Solution

Each column represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

(a) 0.7 mL or (b) 7.0 mL of γ -CyD solution (232 mg/mL) was added to 20 mg of PEG.

第 7 項 PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の推定構造

Fig. 17 は、本節第 1-6 項の結果に基づいて推定した PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の構造を示す。α-CyD は、CyD がスタッキングしてできた空洞チャンネル内に PEG 化インスリン中の PEG 鎖 1 本を包接した結晶性 polypseudorotaxane を形成すること、一方、γ-CyD は 2 本の PEG 鎖を包接して結晶性の polypseudorotaxane を形成することが明らかとなった。さらに、α-CyD polypseudorotaxane は六方晶系、γ-CyD polypseudorotaxane は立方晶系の結晶充填構造を有するものと推定された。また、γ-CyD polypseudorotaxane において、分子間あるいは分子内 polypseudorotaxanes の構造異性体が存在することが示唆された。

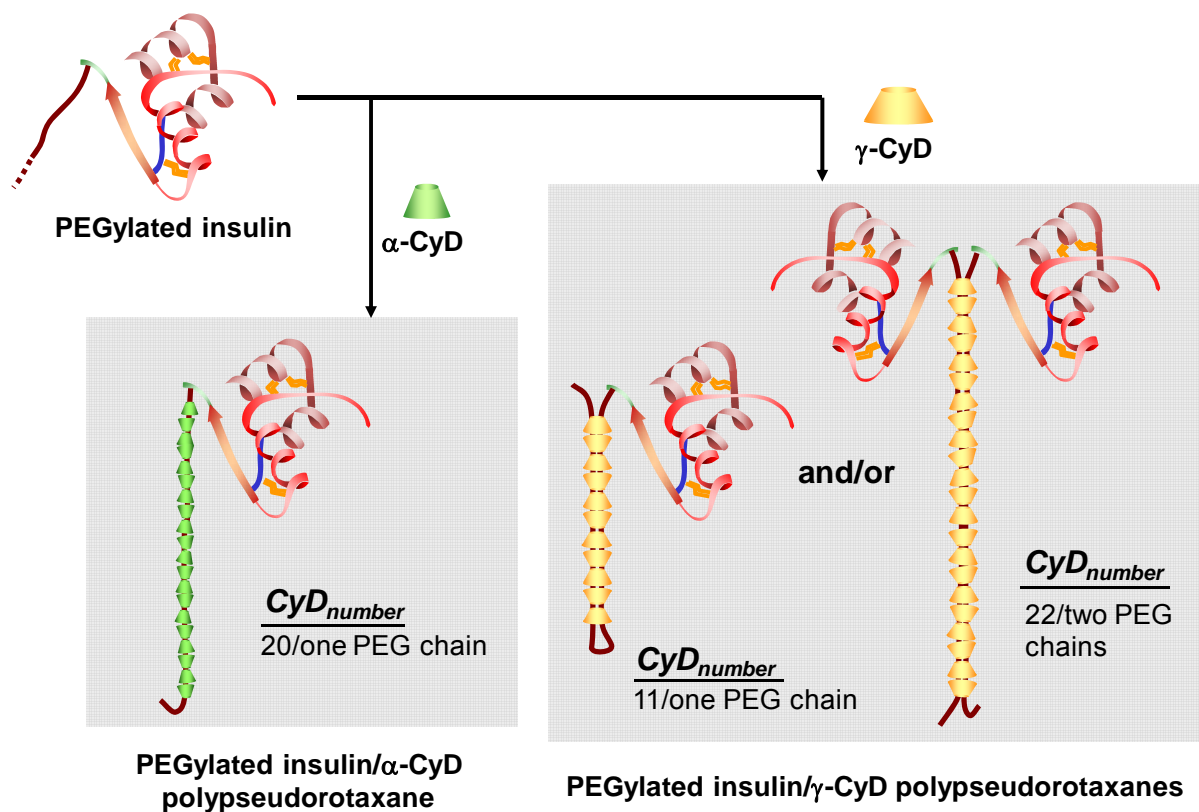


Fig. 17. Proposed Structures of PEGylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes

第 4 節 CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動

前節では、 α - および γ -CyD と PEG 化インスリンとの polypseudorotaxanes を調製し、それらの構造を推定した。そこで本節では、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes の持続性製剤への応用を企図して、CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動を検討した。

第 1 項 各種 CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動

Fig. 18 は pH 7.4 リン酸緩衝液中における PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動を示す。PEG 化インスリン単独はリン酸緩衝液に速やかに溶解したが、CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出は著しく抑制された。さらに、その放出速度は CyDs の種類により異なり、 γ -CyD polypseudorotaxane > α -CyD polypseudorotaxane の順に遅延した。これは、第 2 章 Fig. 34 で後述するように、PEG 化タンパク質中の PEG 鎖と γ -CyD との相互作用が α -CyD に比べて弱いことに起因するものと考えられる。また、Toropainen らは、budesonide/ γ -CyD 系において、立方晶系筒型複合体の溶解速度は六方晶系筒型複合体に比べて速いことを報告している。⁶⁶⁾ 第 3 節 4 項で示したように、 α -CyD は六方晶系、 γ -CyD は立方晶系の polypseudorotaxane を形成することから、これら結晶充填構造の違いが溶解速度に反映された可能性も考えられる。以上の結果から、CyD polypseudorotaxanes は PEG 化インスリンの放出を抑制し、その放出速度は CyDs の種類により制御可能なことが示唆された。

第 2 項 CyD polypseudorotaxanes の PEG 化インスリンの放出挙動におよぼす溶出溶媒量および溶媒中 CyD 濃度の影響

水溶液中では、PEG/CyD polypseudorotaxane は遊離 PEG および CyD と平衡状態で存在する。したがって、CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出速度

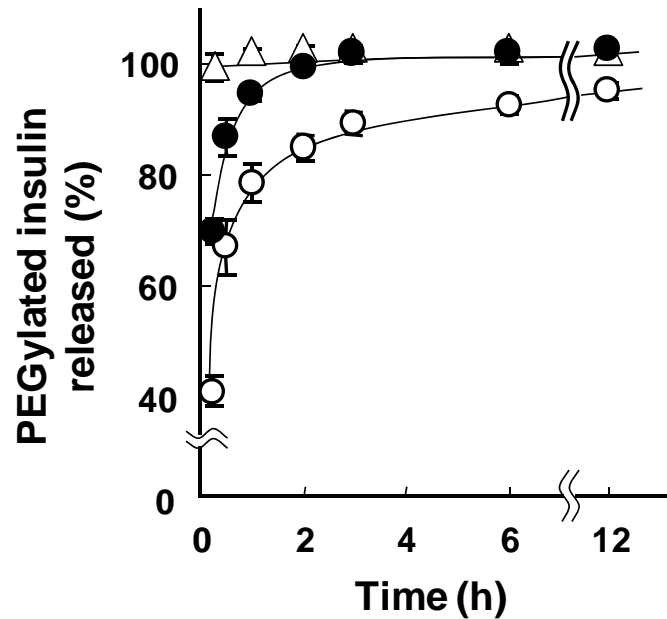


Fig. 18. *In Vitro* Release Profiles of PEGylated Insulin from CyD Polypseudorotaxanes¹⁾ in Phosphate Buffer (pH 7.4, 1.0 mL) at 37°C

○: α-CyD polypseudorotaxane, ●: γ-CyD polypseudorotaxane, △: PEGylated insulin alone.
Each point represents the mean ± S.E. of 3 experiments.

1) The amount of PEGylated insulin was 0.1 μmol.

は、溶出溶媒量や溶媒の CyD 濃度に変化することが予想される。そこで本項では、polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出におよぼす溶出溶媒量および CyD 濃度の影響について検討した。

Fig. 19A, B は、異なった溶媒量 (1, 0.85, 0.45 mL リン酸緩衝液) における PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動を示す。α-および γ-CyD いずれの系においても、PEG 化インスリンの放出は、溶媒量の減少に伴い抑制された (1 mL > 0.85 mL > 0.45 mL)。また、Fig. 19C に示すように、溶媒中に α-CyD を添加すると、α-CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出速度は、4.5 mg/mL > 9 mg/mL > 72.5 mg/mL ≈ 145 mg/mL の順に低下した。γ-CyD polypseudorotaxane においても同様に、PEG 化インスリンの放出は γ-CyD 濃度依存的に抑制された (0 mg/mL > 14.5 mg/mL > 29 mg/mL > 116 mg/mL ≈ 232 mg/mL)。これは、溶媒量の減少や CyD 濃度の増大に伴い、CyD polypseudorotaxane の解離が抑制され、PEG 化インスリンの放出が遅延したことによるものと考えられる。以上の結果より、CyD

polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出速度は溶媒量や溶媒中の遊離 CyDs 濃度により制御可能なことが示唆された。

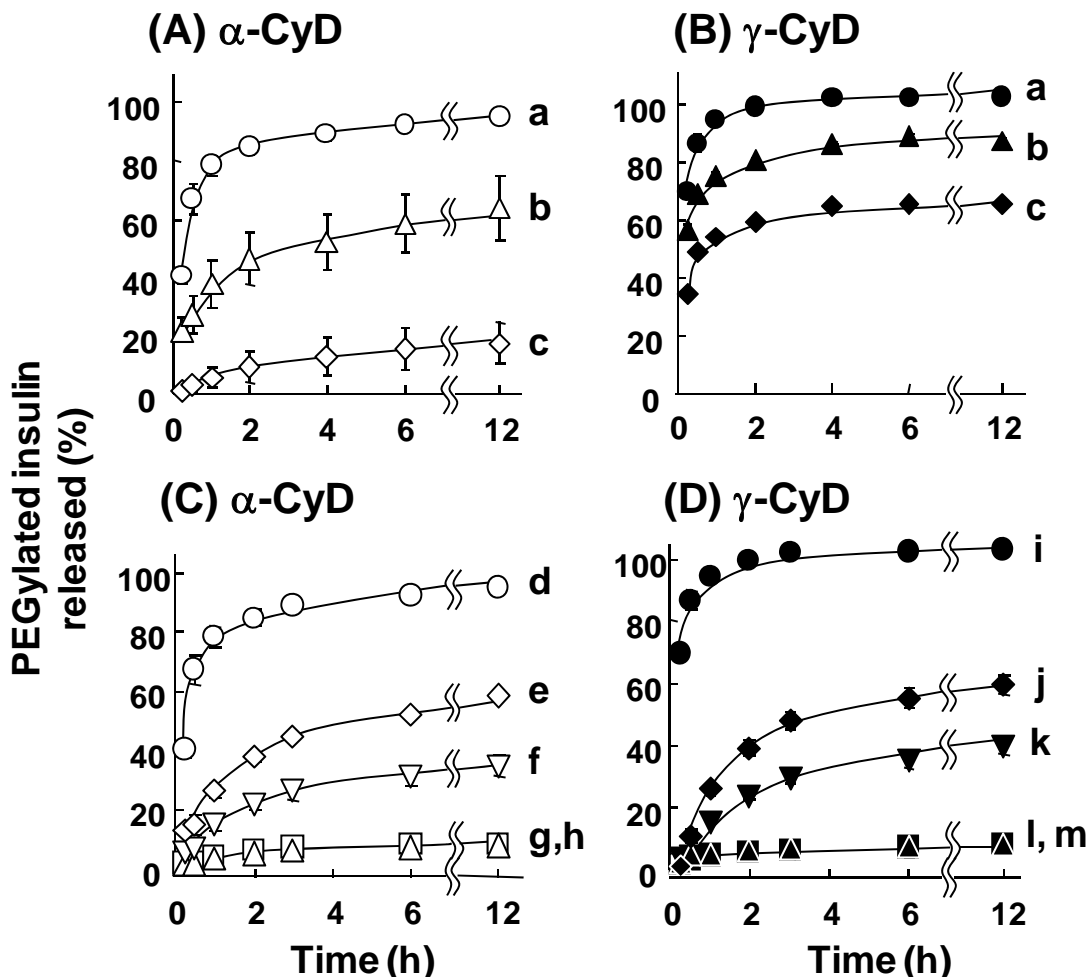


Fig. 19. Release Profiles of PEGylated Insulin from CyD Polypseudorotaxanes¹⁾ in Different Volumes (A, B) or Different CyDs Concentrations (C, D) of Phosphate Buffer (pH 7.4) at 37°C

Figures A and B,

a, in 1 mL; b, in 0.85 mL; c, in 0.45 mL;

Figure C (α -CyD system),

d, in 0 mg/mL; e, in 4.5 mg/mL; f, in 9 mg/mL; g, in 72.5 mg/mL; h, in 145 mg/mL α -CyD;

Figure D (γ -CyD system),

i, in 0 mg/mL; j, in 14.5 mg/mL; k, in 29 mg/mL; l, in 116 mg/mL; m, in 232 mg/mL γ -CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments.

1) The amount of PEGylated insulin was 0.1 μ mol.

第 3 項 CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動におよぼす PEG 導入数の影響

上市されている PEG 化タンパク質の多くは、タンパク質分子内に複数本の PEG がランダムに導入されている (Table 1)。¹¹⁾ 本項ではランダムに複数本の PEG を導入した multi-PEG 化インスリンおよびその CyD polypseudorotaxane を調製し、PEG 化インスリンの放出挙動におよぼす PEG 導入数の影響を検討した。

Multi-PEG 化インスリンは Kim らの方法⁴⁹⁾に従い、DMSO 中で反応させ、透析により精製した (実験の部参照)。なお、生成物の確認は HPLC および MALDI-TOF Mass スペクトルにより、生成物に未反応の PEG が残存していないことは TLC および FAB Mass スペクトルにより確認した。また、HPLC の結果より、非 PEG 化インスリン、mono-、di- および tri-PEG 化インスリン (インスリン : PEG の結合比がそれぞれ 1:0、1:1、1:2 および 1:3) の含有率はそれぞれ 7%、35%、49% および 9% であり、PEG 鎖の平均置換度は約 1.6 であった。Multi-PEG 化インスリンの CyD polypseudorotaxane は本章第 3 節と同様の方法で調製し、polypseudorotaxane 形成は沈殿物形成の肉眼的観察、粉末 X 線回折および ¹H-NMR 測定により確認した。これらの α -CyD polypseudorotaxane を用いて、PEG 化インスリンの放出挙動におよぼす PEG 導入数の影響を検討した結果を Fig. 20 に示す。リン酸緩衝液中における α -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出は、非 PEG 化インスリン > mono-体 > di-体 > tri-体の順に遅延し、PEG 鎖の導入数の増大に伴い低下した。これは、PEG 鎖の増大に伴い、難水溶性部である polypseudorotaxane 部分の割合が増大したためと考えられる。以上の結果より、 α -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出は、PEG 鎖の導入数により異なることが示唆された。

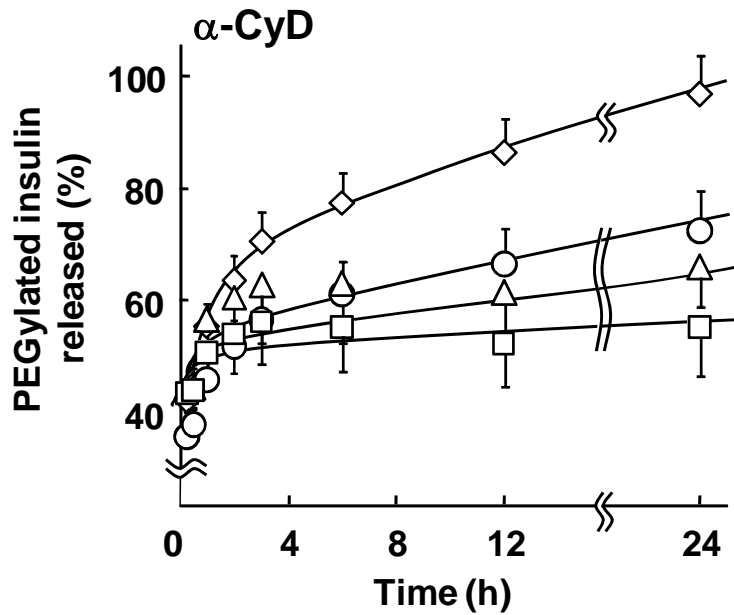


Fig. 20. *In Vitro* Release Profiles of Insulin (◇), Mono- (○), Di- (△) and Tri- (□) PEGylated Insulin from Multi-PEGylated Insulin/α-CyD Polypseudorotaxane¹⁾ in Phosphate Buffer (pH 7.4) at 37°C

Each point represents the mean ± S.E. of 3-4 experiments.

1) The amount of PEGylated insulin was 0.1 μmol.

第 4 項 CyD polypseudorotaxanes から放出後の PEG 化インスリンの高次構造

前項までに、polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出挙動を検討し、放出速度は CyDs の種類、溶媒量、溶媒中の CyD 濃度および PEG 化インスリンの PEG 導入数により制御可能なことが示唆された。持続性タンパク質製剤の場合、長時間後に放出されたタンパク質は native タンパク質と同じ高次構造を保持する必要がある。そこで次に、放出後の PEG 化インスリンの高次構造に関する検討を行った。

Fig. 21 は、CyD polypseudorotaxanes から 24 時間後に放出された PEG 化インスリン (Fig. 18) の CD スペクトルを示す。α- および γ-CyD polypseudorotaxanes から放出された PEG 化インスリンの CD スペクトルは、PEG 化インスリン単独に比べて、210-220 nm 付近の CD 強度に若干変化がみられたものの、CD スペクトルパターンに大きな違いはみられなかった。210-220 nm 付近の CD 強度のわずかな変化は、試料が微量であることによる PEG 化インスリン濃度の誤差、あるいは 37°C で 24 時間の保温による PEG

化インスリンの分解などに起因するものと考えられる。これらの結果は、CyD polypseudorotaxanes から放出された PEG 化インスリンは、PEG 化インスリン単独と同様の高次構造を保持することを示すものであり、polypseudorotaxane 形成やその後の放出に伴う PEG 化インスリンの生理活性の変化は少ないことを示唆する。

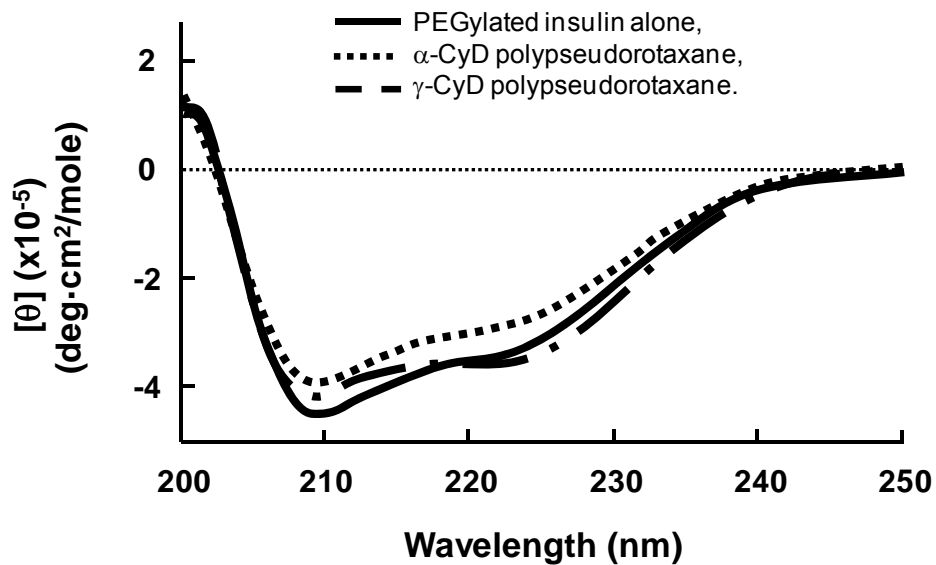


Fig. 21. CD Spectra of PEGylated Insulin (0.1 mM) Released from CyD Polypseudorotaxanes in Phosphate Buffer (pH 7.4) at 25°C

第 5 節 CyD polypseudorotaxanes のラット皮下投与後の PEG 化インスリンの吸収挙動および血糖降下作用

第 1 項 CyD polypseudorotaxanes 皮下投与後の血漿中 PEG 化インスリン濃度および血糖降下作用

インスリンを皮下投与すると、大部分は皮下組織から毛細血管に直接移行し、一部はリンパ管経由で吸収されることが知られている。⁶⁹⁾ また、インスリンの血中濃度の半減期は 5～10 分であるため、⁶⁹⁾ インスリン皮下投与製剤の作用時間を左右するのは、皮下組織から血中への移行時間である。インスリンは通常の製剤中では主に 6 量体で存在するため、皮下投与後、間質液中で分散・希釈され、毛細血管の細孔 (～40 Å) を透過可能な 2 量体もしくは単量体になり、全身血流中へ移行するものと考えられる。⁷⁰⁾ このような観点から、遺伝子工学の技術を駆使して、インスリンの会合特性を改良したインスリンアナログが設計されている。^{6, 71-73)} 例えば、インスリングルルギンは、ヒトインスリンの A 鎖 21 番目のアスパラギンをグリシンに置換し、B 鎖 C 末端の B31 と B32 に 2 個のアルギニン残基を付加したインスリンアナログであり、カートリッジ内 (pH 4.0) では無色透明の溶液であるが、皮下投与後、組織内 (pH 7.4) で等電点沈澱し、徐々に溶解するため持続効果を発揮する。また、B28 のプロリンと B29 のリジンを入れ換えたインスリンリスプロあるいは B28 プロリンをアスパラギン酸に変換したインスリンアスパルトは、投与後速やかに単量体として吸収されるため、超速効型アナログとして汎用されている。本研究で対象とした PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes は難水溶性であるため、皮下投与後、徐々に分散・希釈されることで持続効果を示すものと期待される。第 4 節で示したように、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出は著しく遅延した。そこで本節では、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes のラット皮下投与後の血漿中インスリン濃度および血糖降下作用を検討した。

Fig. 22 は、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxane (3.7 U/kg) をラット背部皮下に投与後の血漿中インスリン濃度の時間推移を示す。また、Table 5 に血漿中インスリン濃度推移から算出した薬物速度論的パラメータを示す。なお、CyD polypseudorotaxanes 沈殿

物をリン酸緩衝液のみで希釈すると、polypseudorotaxanes は速やかに PEG 化インスリンと CyD に溶解、解離する (第 4 節 2 項参照)。そこで本検討では、 α - および γ -CyD polypseudorotaxanes の解離を抑制するため、polypseudorotaxane 沈殿物の希釈溶媒としてそれぞれ α -CyD (145 mg/mL) および γ -CyD (232 mg/mL) 含有溶液を用いた。また、対照として用いたインスリン単独を 3.7 U/kg 投与すると、低血糖が惹起されたため、投与量は 2 U/kg に設定した。

Fig. 22 に示すように、インスリン単独を皮下投与すると、血漿中インスリン濃度は投与 15 分後に最高血漿中濃度 (C_{max}) に達し、その後速やかに低下した。PEG 化インスリン単独投与においても速やかに C_{max} に達し (最高血中濃度到達時間 (T_{max}) = 約 25 分)、その後速やかに消失した。また、前節で述べたように、*in vitro* 持続放出性を示した α -CyD polypseudorotaxane は、予想に反して、血漿中インスリン濃度の有意な上昇は観察されなかった。一方、 γ -CyD polypseudorotaxane は投与後約 78 分で C_{max} を示し、その後も有意に高い血漿中インスリン濃度を維持した。さらに、その血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) はインスリン単独や PEG 化インスリンと比較して有意に増大した。

Fig. 23 および Table 6 は PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes をラット皮下投与後の血漿中グルコース濃度時間推移とそれらの薬力学的パラメータを示す。インスリンおよび PEG 化インスリンは投与後 2 時間以内に最大血糖降下作用 (C_{nadir}) を示し、その後血糖値は速やかに回復した。 α -CyD polypseudorotaxane は、血漿中インスリン濃度 (Fig. 22) を反映して、血糖降下作用をほとんど示さなかった。一方、 γ -CyD polypseudorotaxane は、3.7 時間に最大血糖降下作用到達時間 (T_{nadir}) を与え、 C_{nadir} は約 35% に低下し、その後も有意に低い血糖値を維持した。また、 γ -CyD polypseudorotaxane 皮下投与 12 時間後までの血糖値-時間曲線下面積 (AUC_G) は、インスリンおよび PEG 化インスリンのそれに比べて有意に増大した。Table 6 に示すように、血糖降下作用の持続性の指標となる平均血糖降下時間 (MRT_G) は γ -CyD polypseudorotaxane 投与において著しく延長したことから、 γ -CyD polypseudorotaxane は PEG 化インスリン持続放出システムとして機能することが明らかとなった。

α -CyD polypseudorotaxane 投与により、血漿中インスリン濃度の上昇や血糖降下作用が低かった理由として、1) α -CyD polypseudorotaxane の溶解・解離に伴う PEG 化インスリンの

放出が遅いこと、2) 遊離 α -CyD による PEG 化インスリンの *in vivo* 酵素活性への影響などが考えられる。一方、 γ -CyD polypseudorotaxane 投与により AUC 値や AUC_G 値が有意に増大した理由として、 α -CyD polypseudorotaxane に比べて、 γ -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出速度が適切であったものと考えられる。さらに、1) 遊離 γ -CyD による吸収促進作用、2) 遊離 γ -CyD もしくは polypseudorotaxane 形成 (難水溶化) による酵素安定性の向上などが考えられる。そこで、次項では、それらの影響について検討した。

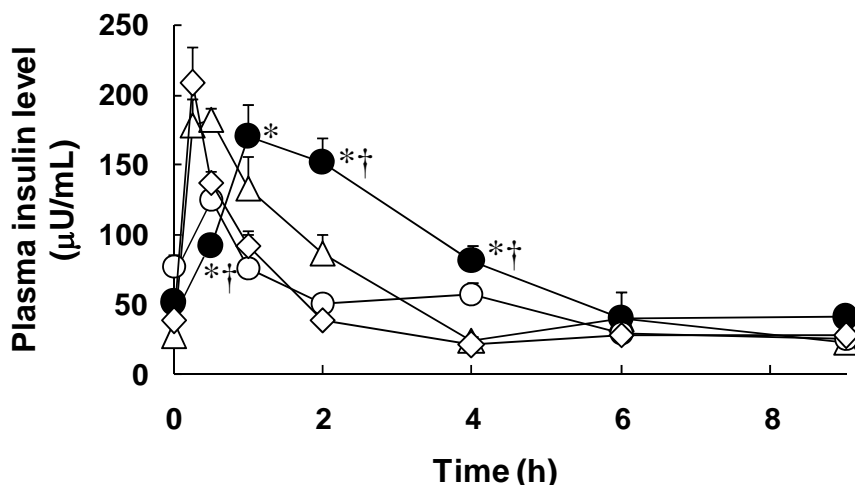


Fig. 22. Plasma Levels of Insulin after Subcutaneous Administrations of Insulin 2 U/kg (◇), PEGylated Insulin 3.7 U/kg (△) and It's α -CyD¹⁾ (○) and γ -CyD²⁾ (●) Polypseudorotaxanes 3.7 U/kg to Rats

Each point represents the mean \pm S.E. of 4-10 experiments.

*, $p < 0.05$ versus insulin. †, $p < 0.05$ versus PEGylated insulin.

1) α -CyD polypseudorotaxane was diluted with 145 mg/mL α -CyD solution.

2) γ -CyD polypseudorotaxane was diluted with 232 mg/mL γ -CyD solution.

Table 5. *In Vivo* Pharmacokinetics Parameters of Insulin, PEGylated Insulin and It's CyD Polypseudorotaxanes

Sample	T_{max} (h) ¹⁾	C_{max} (μ U/mL) ²⁾	AUC (μ U/mL · h) ³⁾	MRT (h) ⁴⁾
Insulin	0.25 ± 0.00 †	208 ± 26	427 ± 16	2.4 ± 0.2
PEGylated insulin	0.42 ± 0.10 *	207 ± 17	521 ± 81	2.2 ± 0.1
α -CyD polypseudorotaxane (in 145 mg/mL α -CyD sol.)	0.5 ± 0.00 *	124 ± 13 * †	511 ± 23 *	2.4 ± 0.2
γ -CyD polypseudorotaxane (in 232 mg/mL γ -CyD sol.)	1.3 ± 0.20 * †	184 ± 22	896 ± 85 * †	2.2 ± 0.1

Each value represents the mean \pm S.E. of 4-10 experiments.

*, $p < 0.05$ versus insulin. †, $p < 0.05$ versus PEGylated insulin.

1) Time required to reach the maximum plasma insulin level.

2) Maximum plasma insulin level.

3) Area under the plasma insulin level-time curve up to 12 h post-administration.

4) Mean residence time in plasma.

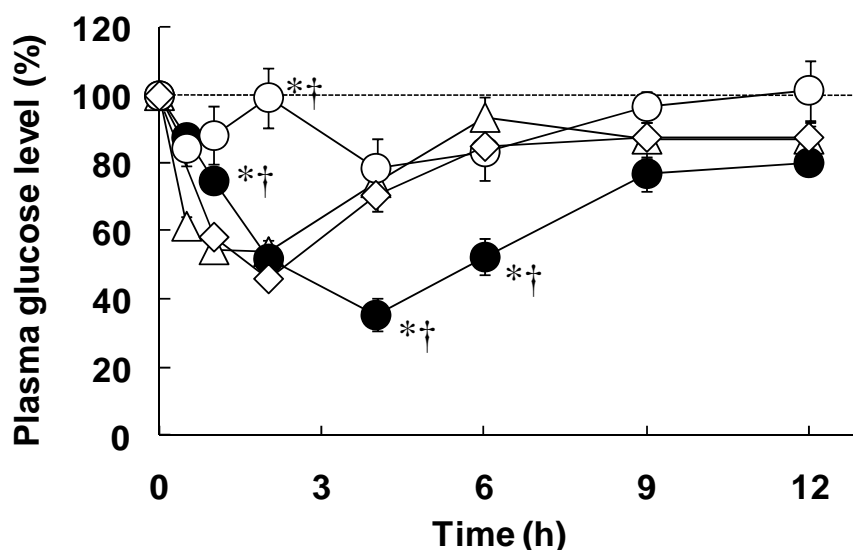


Fig. 23. Plasma Levels of Glucose after Subcutaneous Administrations of Insulin 2 U/kg (◇), PEGylated Insulin 3.7 U/kg (△) and It's α -CyD¹⁾ (○) and γ -CyD²⁾ (●) Polypseudorotaxanes 3.7 U/kg to Rats

Each point represents the mean \pm S.E. of 4-10 experiments.

*, $p < 0.05$ versus insulin. †, $p < 0.05$ versus PEGylated insulin.

1) α -CyD polypseudorotaxane was diluted with 145 mg/mL α -CyD solution.

2) γ -CyD polypseudorotaxane was diluted with 232 mg/mL γ -CyD solution.

Table 6. *In Vivo* Pharmacodynamic Parameters of Insulin, PEGylated Insulin and It's CyD Polypseudorotaxanes

Sample	T_{nadir} (h) ¹⁾	C_{nadir} (%) ²⁾	AUC_G (% \cdot h) ³⁾	MRT_G (h) ⁴⁾
Insulin	2.0 \pm 0.0	46 \pm 1	275 \pm 16	2.2 \pm 0.1
PEGylated insulin	1.6 \pm 0.2	49 \pm 2	265 \pm 39	2.9 \pm 0.3
α -CyD polypseudorotaxane (in 145 mg/mL α -CyD sol.)	2.9 \pm 1.3	69 \pm 7 ^{*†}	136 \pm 45	2.2 \pm 0.3
γ -CyD polypseudorotaxane (in 232 mg/mL γ -CyD sol.)	3.7 \pm 0.3 ^{*†}	35 \pm 5 [*]	442 \pm 25 ^{*†}	6.8 \pm 1.6 ^{*†}

Each value represents the mean \pm S.E. of 4-10 experiments.

*, $p < 0.05$ versus insulin. †, $p < 0.05$ versus PEGylated insulin.

1) Time to nadir plasma glucose levels.

2) Nadir plasma glucose levels.

3) The cumulative percentage of change in plasma glucose levels up to 12 h post-administration.

4) Mean reduced time of plasma glucose levels.

第 2 項 インスリンの血糖降下作用におよぼす遊離 CyD の影響

前述のように、polypseudorotaxanes をラット皮下投与する際、polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリン放出を遅延させるため、polypseudorotaxanes を各 CyD 溶液で希釈した。したがって、polypseudorotaxanes 化による PEG 化インスリンの AUC 値や AUC_G 値の減少および増大に、遊離形 CyD 濃度の関与が予想される。そこで本項では、インスリンおよび PEG 化インスリンの血糖降下作用におよぼす CyD 添加濃度の影響を検討した。

α -CyD polypseudorotaxane の血糖降下作用が低かった理由として、polypseudorotaxane からの α -CyD の解離が極めて遅いため、PEG 化インスリンが十分に放出されなかった可能性が考えられる。事実、 α -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出は γ -CyD polypseudorotaxane に比べて遅く (Fig. 18)、低濃度の α -CyD 存在下においても放出は著しく抑制された (Fig. 19C)。そこで、PEG 化インスリン/ α -CyD polypseudorotaxane の希釈溶媒中の α -CyD 濃度を 145 mg/mL の 1/2 の 72.5 mg/mL に設定して血糖降下作用を調べた。Fig. 24A は、PEG 化インスリン/ α -CyD polypseudorotaxane 沈殿物を 72.5 mg/mL α -CyD 溶液に添加した懸濁液をラット背部皮下に投与後、経時的に血漿中グルコース濃度を測定した結果を示す。145 mg/mL α -CyD 溶液に希釈した polypseudorotaxane は、ほとんど血糖降下作用を示さなかったのに対して、72.5 mg/mL の系においては血糖降下作用が現れ、その作用は持続化する傾向を示した。以上の結果より、145 mg/mL α -CyD 添加系において α -CyD polypseudorotaxane の血糖降下作用が低かった理由として、polypseudorotaxane から PEG 化インスリンへの解離が著しく遅いため、PEG 化インスリンの放出が不十分であったものと推定される。

Fig. 24B は、PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane 沈殿物を 116 mg/mL γ -CyD 溶液に添加後、同様の検討を行った結果を示す。PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane の血糖降下作用は、希釈する溶媒中の γ -CyD 濃度に依存し、PEG 化インスリン単独 < 116 mg/mL γ -CyD 系 < 232 mg/mL γ -CyD 系の順に遅延した。さらに、 T_{nadir} 、AUC_G および MRT_G においても γ -CyD 濃度依存性が確認された (Table 7)。

以上の結果より、 γ -CyD polypseudorotaxane 化による PEG 化インスリンの AUC 値や AUC_G 値の増大に遊離形 γ -CyD の関与が示唆され、さらに、 γ -CyD polypseudorotaxane は、希釈する溶媒中の γ -CyD 濃度を調節することにより、PEG 化インスリンの放出を制御可能なことが示唆された。

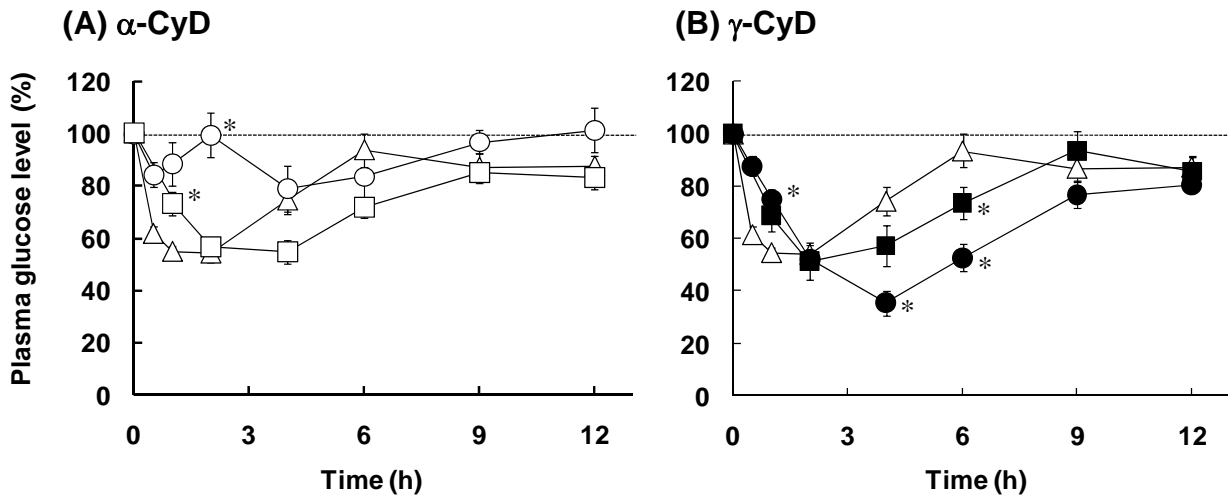


Fig. 24. Plasma Levels of Glucose after Subcutaneous Administrations of PEGylated Insulin and Its α -CyD (A) and γ -CyD (B) Polypseudorotaxanes to Rats

△: PEGylated insulin
 □: α -CyD polypseudorotaxane in 72.5 mg/mL
 ○: α -CyD polypseudorotaxane in 145 mg/mL
 △: PEGylated insulin
 ■: γ -CyD polypseudorotaxane in 116 mg/mL
 ●: γ -CyD polypseudorotaxane in 232 mg/mL

Each point represents the mean \pm S.E. of 3-10 experiments.

*, $p < 0.05$ versus PEGylated insulin.

Table 7. *In Vivo* Pharmacodynamic Parameters of Insulin, PEGylated Insulin and Its CyD Polypseudorotaxanes

Sample	T_{nadir} (h)	C_{nadir} (%)	AUC_G (%·h)	MRT_G (h)
PEGylated insulin	1.6 ± 0.2	49 ± 2	265 ± 39	2.9 ± 0.3
α -CyD polypseudorotaxane (in 72.5 mg/mL α -CyD sol.)	$2.7 \pm 0.7^*$	53 ± 4	325 ± 4	2.5 ± 0.1
α -CyD polypseudorotaxane (in 145 mg/mL α -CyD sol.)	2.9 ± 1.3	$69 \pm 7^*$	136 ± 45	2.2 ± 0.3
γ -CyD polypseudorotaxane (in 116 mg/mL γ -CyD sol.)	2.0 ± 0.0	51 ± 5	305 ± 46	3.4 ± 1.0
γ -CyD polypseudorotaxane (in 232 mg/mL γ -CyD sol.)	$3.7 \pm 0.3^*$	35 ± 5	$442 \pm 25^*$	$6.8 \pm 1.6^*$

Each value represents the mean \pm S.E. of 3-10 experiments.

*, $p < 0.05$ versus PEGylated insulin.

次に、 α - および γ -CyD がインスリンの吸収や血糖降下作用に直接影響する可能性について検討した。なお、予備的検討として α - および γ -CyD 単独のみを皮下投与しても、血漿中グルコース濃度は変化しないことを確認した。

Fig. 25 は、インスリン (非 PEG 化) を α -CyD (145 mg/mL) あるいは γ -CyD 水溶液 (232 mg/mL) に溶解した溶液をラット背部皮下に投与後、血漿中グルコース濃度を測定した結果を示し、Fig. 26 にはそれらの AUC_G 値を示す。インスリンの血糖降下作用は α -CyD 同時投与により低下し、 AUC_G 値も有意に減少した。Fig. 21 に示したように α -CyD polypseudorotaxane から放出された PEG 化インスリンは native と同様の高次構造を保持すること、さらに、第 2 章 5 節で後述するように α -CyD polypseudorotaxane から放出された PEG 化リゾチームは PEG 化リゾチーム単独とほぼ同じ酵素活性を保持することから、遊離 α -CyD がインスリンの高次構造や *in vitro* 酵素活性に影響を与える可能性は低いものと考えられる。 α -CyD によるインスリンの血糖降下作用低減に関する詳細な理由は不明であるが、 α -CyD polypseudorotaxane 投与系における PEG 化インスリンの血糖降下作用の低下に対して、先述の PEG 化インスリンの放出抑制以外に、遊離 α -CyD の関与も示唆された。一方、 γ -CyD はインスリンの血糖降下作用を僅かに増大させ、 AUC_G 値も上昇させたことから、遊離 γ -CyD が皮下組織内において吸収促進剤として働くことが示唆された。しかし、 γ -CyD polypseudorotaxane 投与による PEG 化インスリンの AUC_G 値増大効果は、これら AUC_G 値の上昇に比べて有意に大きいことから、遊離 γ -CyD による吸収促進効果の影響は小さいものと考えられる。そこで、次項では、 γ -CyD polypseudorotaxane 化による PEG 化インスリンの酵素安定性について検討を行った。

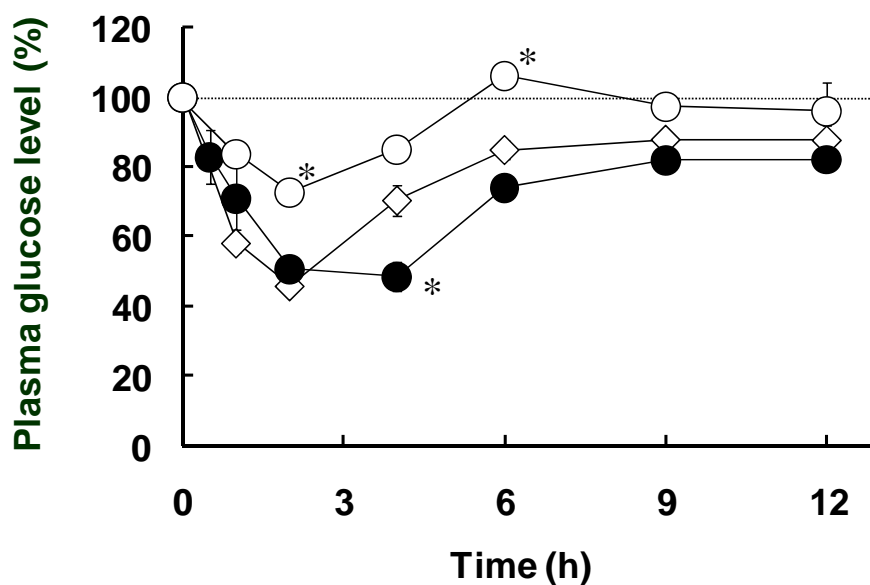


Fig. 25. Plasma Levels of Glucose after Subcutaneous Administrations of Insulin Solution 2 U/kg (◇) with α -CyD¹ (○) and γ -CyD² (●) to Rats
 Each point represents the mean \pm S.E. of 3-5 experiments.

*, $p < 0.05$ versus insulin.

1) Insulin was dissolved in 145 mg/mL α -CyD solution.

2) Insulin was dissolved in 232 mg/mL γ -CyD solution.

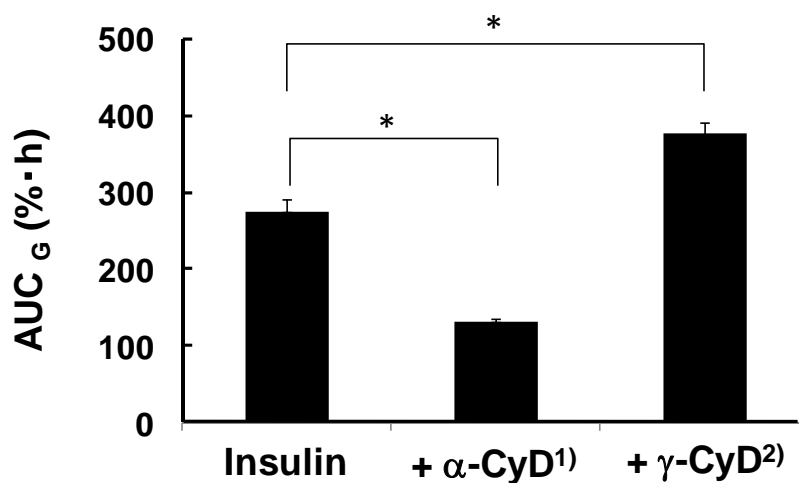


Fig. 26. AUC_G after Subcutaneous Administrations of Insulin Solution 2 U/kg with α -CyD¹ and γ -CyD² to Rats

Each column represents the mean \pm S.E. of 3-5 experiments.

*, $p < 0.05$ versus insulin.

1) Insulin was dissolved in 145 mg/mL α -CyD solution.

2) Insulin was dissolved in 232 mg/mL γ -CyD solution.

第 3 項 PEG 化インスリンの酵素安定性におよぼす γ -CyD polypseudorotaxanes 化の影響

γ -CyD polypseudorotaxane は難水溶性であり、投与後、皮下組織内において固体として存在することから、酵素安定性は向上するものと考えられる。また、 γ -CyD polypseudorotaxane の希釈溶媒中の遊離 γ -CyD が PEG 化インスリンの酵素安定性を改善する、あるいはタンパク質分解酵素の活性を阻害する可能性も考えられる。そこで本項では、 γ -CyD polypseudorotaxane 化による PEG 化インスリンの酵素安定性について検討した。

Fig. 27 は、 γ -CyD polypseudorotaxane にタンパク質分解酵素トリプシンを添加後、未分解のインスリン量を経時的に測定した結果を示す。インスリン単独あるいはインスリンに γ -CyD (232 mg/mL) を添加した系において、インスリンは 24 時間以内にほぼ完全に分解され、遊離 γ -CyD がインスリンの酵素安定性に影響しないことが示唆された。また、PEG 化インスリン単独も 24 時間以内にほぼ完全に分解され、本実験条件下では PEG 化によるインスリンの酵素安定性の改善はみられなかった。本実験条件下における PEG 化インスリンの酵素不安定性の詳細な機構は不明であるが、インスリンが会合すると酵素安定性は向上することから、PEG 化によりインスリン会合が抑制され、⁴⁹⁾ その会合特性の変化が酵素安定性に影響したものと考えられる。一方、 γ -CyD polypseudorotaxane においては、24 時間後も約 90% の PEG 化インスリンが残存しており、著しい酵素安定化が観察された。これは、 γ -CyD polypseudorotaxane 化により、PEG 化インスリンが固相に存在するため、トリプシンとの反応性が低下したことに起因するものと考えられる。以上の結果より、Fig. 23 に示した γ -CyD polypseudorotaxane 化による PEG 化インスリンの AUC_G 値増大効果には、 γ -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの適度な放出遅延に加えて、polypseudorotaxane 化による酵素安定性の向上も寄与することが示唆された。

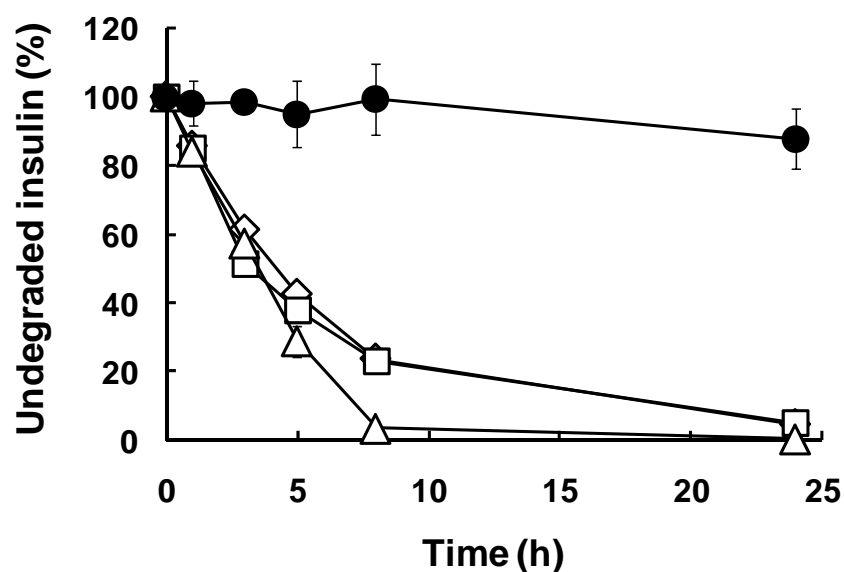


Fig. 27. Degradation Profiles of Insulin (◇), Insulin/γ-CyD¹⁾ (□), PEGylated Insulin (△) and PEGylated Insulin/γ-CyD Polypseudorotaxane²⁾ (●) Incubated with Trypsin

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

1) Insulin was dissolved in 232 mg/mL γ -CyD solution.

2) γ -CyD polypseudorotaxane was diluted with 232 mg/mL γ -CyD solution.

第 6 節 市販の持続性インスリン製剤と γ -CyD polypseudorotaxanes の血糖降下作用の比較

Fig. 28 は、実際に臨床使用されている持続性インスリン製剤 A と PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane の血糖降下作用を比較した結果を示す。PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane はわずかではあるが、市販の持続性インスリン製剤 A に比べ血糖降下作用を遅延した。前節で述べたように γ -CyD polypseudorotaxane は制御放出特性も有することから、本システムの臨床応用における有用性が期待できる。

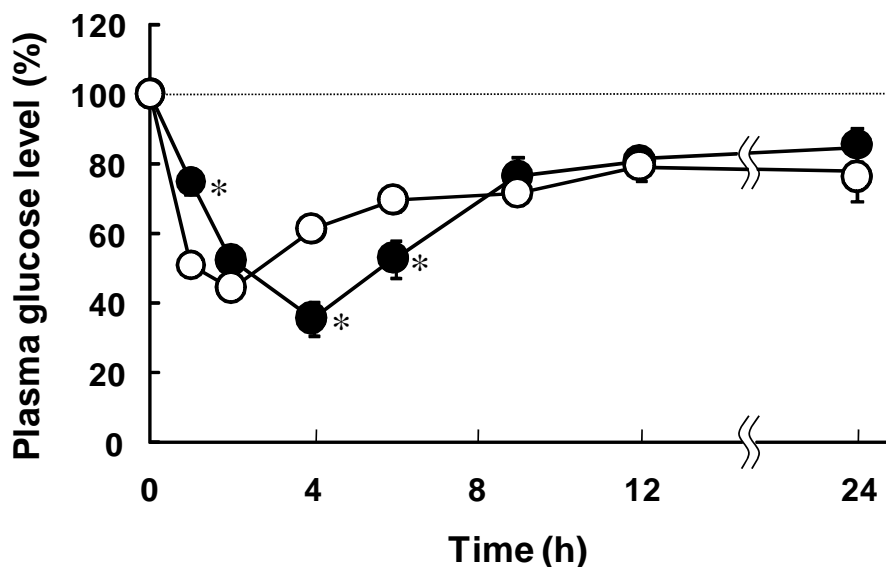


Fig. 28. Plasma Levels of Glucose after Subcutaneous Administrations of Commercial Available Sustained Release Insulin Product 2 U/kg (○) and PEGylated Insulin/ γ -CyD Polypseudorotaxane 3.7 U/kg (●) to Rats

Each point represents the mean \pm S.E. of 4-10 experiments.

*, $p < 0.05$ versus commercial available sustained release insulin product.

第 7 節 小括

本章では、PEG 化インスリンおよび CyD polypseudorotaxanes を調製し、その包接構造や結晶内充填様式、polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリン放出挙動ならびに放出後の PEG 化インスリンの高次構造を検討した。さらに、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes をラットに皮下投与後の血漿中インスリン濃度および血糖降下作用を比較検討して、CyD polypseudorotaxane の徐放性システムとしての有用性評価を行った。以下に得られた知見を要約する。

- 1) インスリンに mPEG-OSu を反応させて PEG 鎖 1 本が結合した PEG 化インスリンを調製した。α- および γ-CyD 水溶液に PEG 化インスリンを添加し、4°C で 12 時間静置すると、PEG 化インスリン/α- および γ-CyD polypseudorotaxanes の結晶性沈殿物が形成された。
- 2) PEG 化インスリン/α- および γ-CyD polypseudorotaxanes 固体試料の FT-IR スペクトルおよび粉末 X 線回折パターンから、α- および γ-CyD は PEG 化インスリン中の PEG 鎖を包接して CyD polypseudorotaxanes を形成すること、さらに、α-CyD および γ-CyD polypseudorotaxanes は結晶内においてそれぞれ六方晶系および立方晶系筒型構造を有するものと推定された。また、CyD polypseudorotaxanes の化学量論比から、α-CyD は PEG 化インスリンの PEG 鎖 1 本と、一方 γ-CyD は PEG 鎖 2 本と polypseudorotaxanes を形成するものと推定された。さらに、end-capped PEG 誘導体を用いた polypseudorotaxane 形成、γ-CyD polypseudorotaxanes の収率におよぼす γ-CyD 水溶液量の影響を検討した結果、空洞径が大きな γ-CyD は、PEG 化インスリン 2 分子の PEG 鎖が平行に並んで包接された分子間 polypseudorotaxane のみならず、PEG 化インスリン 1 分子中の PEG 鎖が折れ曲がって包接された分子内 polypseudorotaxane も形成する可能性が示唆された。

- 3) CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出は抑制され、放出速度は γ -CyD polypseudorotaxane > α -CyD polypseudorotaxane の順に遅延した。Polypseudorotaxanes からの PEG 化インスリンの放出速度は、溶出溶媒量の減少、溶媒中の遊離 CyD 濃度の上昇あるいはインスリン分子への PEG 導入数の増大に伴い抑制された。さらに、CD スペクトルの結果から、CyD polypseudorotaxanes から放出された PEG 化インスリンは PEG 化インスリン単独と同様の高次構造を保持し、生理活性に影響をおよぼさないことが示唆された。
- 4) PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane をラット背部に皮下投与すると、血漿中インスリン濃度や血糖降下作用はインスリンや PEG 化インスリン単独投与に比べて有意に増大するとともに、顕著な持続効果が観察された。この理由として、 γ -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出速度が適切であったこと、 γ -CyD polypseudorotaxane 化により PEG 化インスリンの酵素安定性が向上したことなどが推定された。一方、 α -CyD polypseudorotaxane をラット背部に皮下投与しても、血漿中インスリン濃度の上昇および血糖降下作用はほとんど観察されなかった。この理由として、 α -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出が極めて遅いため、血漿中 PEG 化インスリン濃度が不十分であること、インスリンの吸収や活性に対する α -CyD 自身の影響などが考えられた。これらの結果は、CyD の種類、CyD polypseudorotaxanes を希釈する溶媒中の CyD 濃度を調節することにより、PEG 化インスリンの放出速度を制御可能なことを示唆する。
- 5) PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane は市販の持続性インスリン製剤に比べて血糖降下作用を若干遅延した。

以上の知見から、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes は、CyDs の種類あるいは添加 CyD 濃度を調節することにより PEG 化インスリンの放出速度を制御可能であり、本 CyD polypseudorotaxanes が PEG 化インスリンの制御放出システムとして有用であることが示唆された。

分子量、構造、物性が異なるニワトリ卵白リゾチーム（以下リゾチームと略記する）を用いて、その PEG 修飾体の調製、PEG 化リゾチームと CyDs との polypseudorotaxanes の調製、polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出挙動、放出後の PEG 化リゾチームの酵素活性を比較検討した。

第 2 節 PEG 化リゾチームの調製と構造

本節では、PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxane 調製の前段階として、平均分子量 2000 の PEG 鎖を 1~2 個リゾチーム分子に導入した PEG 化リゾチームを調製した。調製した PEG 化リゾチームの分子量は MALDI-TOF Mass スペクトル、導入した PEG 鎖の平均置換度は HPLC により推定した。

第 1 項 PEG 化リゾチームの調製

Fig. 30 は PEG 化リゾチームの合成経路を示す。Yamasaki らの方法⁸⁰⁾に従い、mPEG-OSu を pH 8.0 リン酸緩衝液中でリゾチームのアミノ基と反応させ、透析 (Spectra/Por[®] Membrane MWCO: 3500) により精製した。なお、調製物中に未反応の PEG が残存しないことを TLC および FAB Mass スペクトルにより確認した。

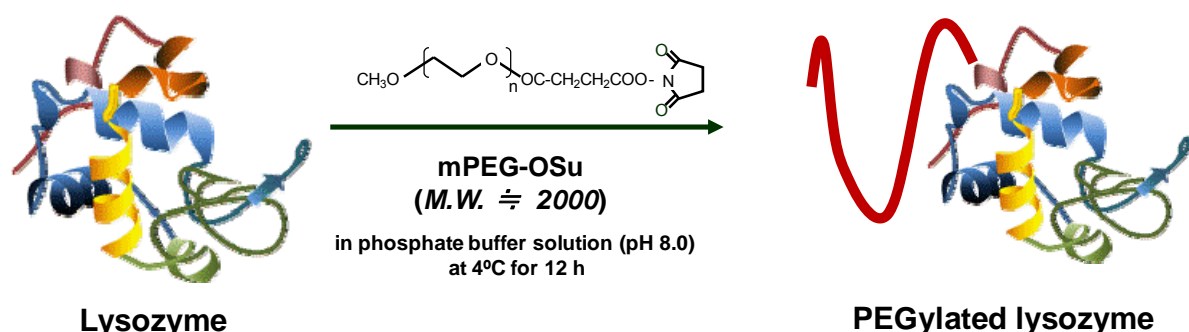


Fig. 30. Preparation of PEGylated Lysozyme

第 2 項 PEG 化リゾチームの置換度と分子量測定

Fig. 31a は PEG 化リゾチームの MALDI-TOF Mass スペクトルを示す。質量数 16500、18500 付近に分散したピークを与えた。これらの値は、リゾチームと PEG がモル比 1:1 および 1:2 で結合した PEG 化リゾチームの分子量と一致した。

Fig. 31b は PEG 化リゾチームの HPLC チャートを示す。PEG 化リゾチームの HPLC チャートは、保持時間 13.0 分、13.8 分に mono- および di-PEG 化リゾチーム由来のピークを与え、ピーク面積から算出した含有率はそれぞれ 80% および 3% であった。また、PEG 化リゾチームに結合した PEG 鎖の平均置換度は約 0.85 であった (Table 8)。

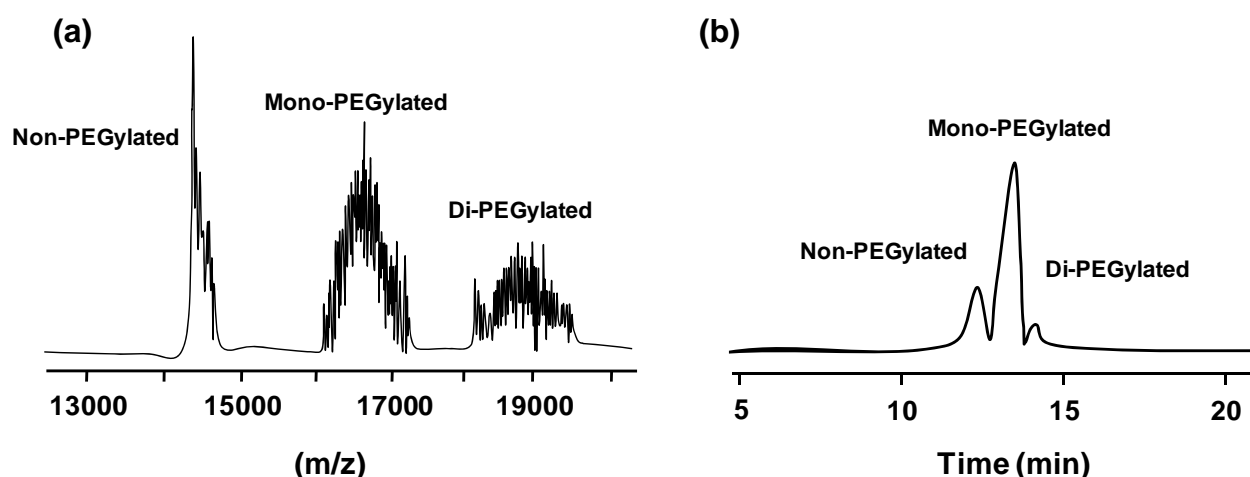


Fig. 31. MALDI-TOF Mass Spectrum (a) and HPLC Chromatogram¹⁾ (b) of PEGylated Lysozyme

1) Solvent A, 0.1% trifluoroacetic acid in 30% acetonitrile ; solvent B, 0.1% trifluoroacetic acid in 95% acetonitrile. HPLC was conducted in linear gradient of 0% to 100% of solution B over 60 min, at a flow rate of 1.0 mL/min, using a C18 (4.0 x 250 mm) column. The effluent was monitored by UV at 280 nm.

Table 8. Composition of PEGylated Lysozyme

	Lysozyme content ¹⁾ (%)			D.S.
	Non-PEGylated	Mono-PEGylated	Di-PEGylated	
PEGylated lysozyme	17	80	3	0.85

1) Determined by RP-HPLC method.

第 3 節 PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の調製と構造

本節では、PEG 化リゾチームと CyD との polypseudorotaxane を調製した。polypseudorotaxane 形成は、沈殿物形成の有無を肉眼的に観察することにより確認した。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルおよび粉末 X 線回折法によりそれらの構造を推定した。

第 1 項 PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の調製

Fig. 32 は PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の調製方法を示す。Harada らの方法²¹⁾に従い、高濃度の CyDs 水溶液に PEG 化リゾチーム水溶液を添加し、 4°C で 12 時間静置することにより調製した。

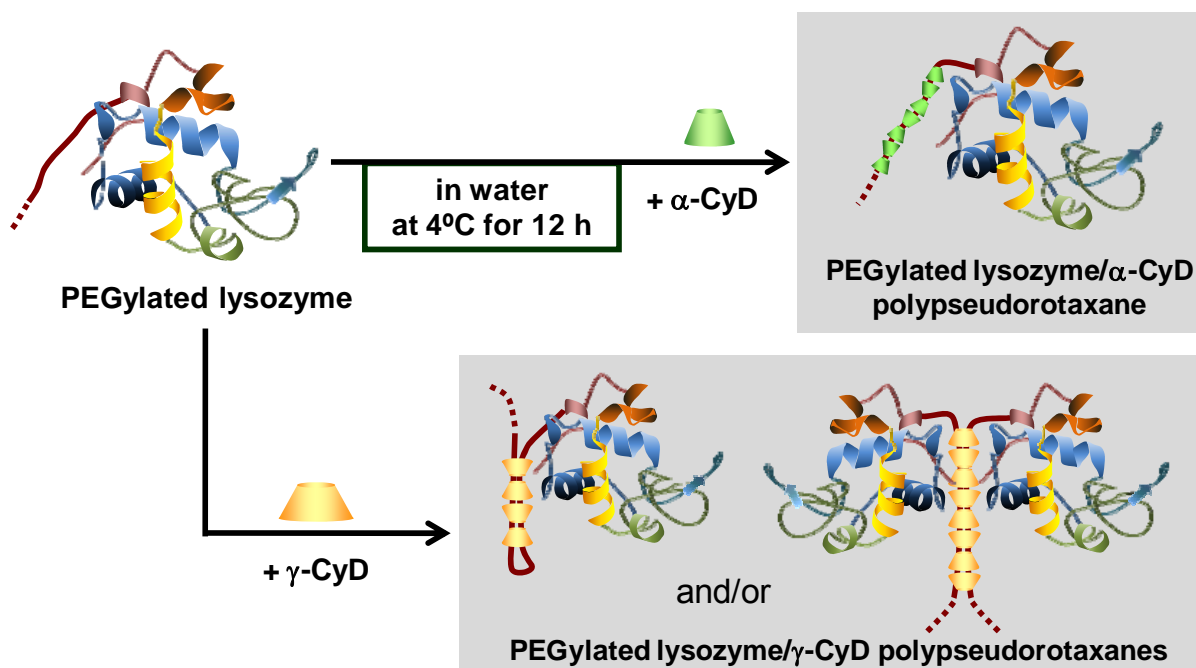


Fig. 32. Preparation of PEGylated Lysozyme/CyD Polypseudorotaxanes

第 2 項 沈殿物形成の肉眼的観察

Fig. 33 は PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の調製終了時における溶液を肉眼的に観察した結果を示す。 α - および γ -CyD 水溶液に非 PEG 化リゾチームを添加した系や β -CyD 水溶液に PEG 化リゾチームを添加した系では沈殿物は形成されなかった。一方、 α - および γ -CyD 水溶液に PEG 化リゾチームを添加すると、速やかに沈殿物の形成が観察された。PEG 単独や PEG 化インスリン (第 1 章 3 節) の場合も同様の沈殿物を形成することから、PEG 化リゾチーム分子中の PEG 鎖は α - および γ -CyD と polypseudorotaxane を形成することが示唆された。

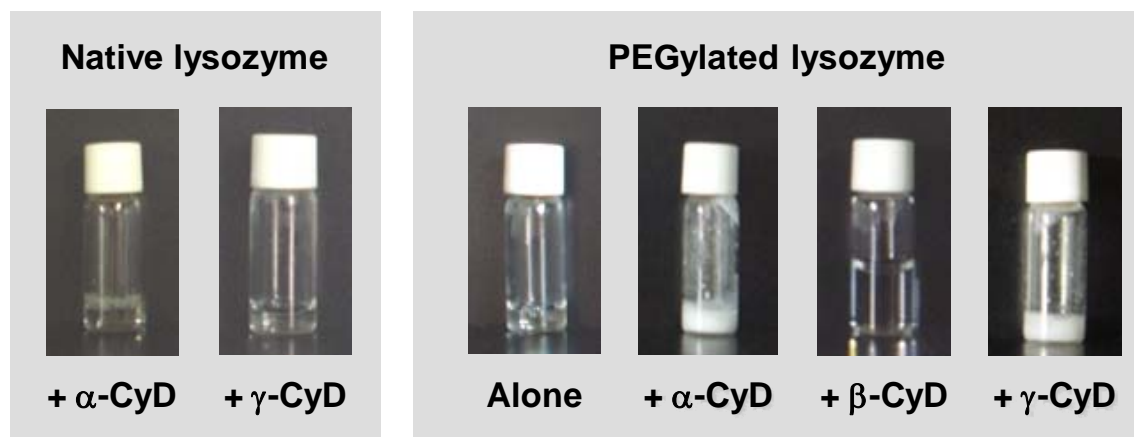


Fig. 33. Photographs of PEGylated Lysozyme/CyD Polypseudorotaxanes

第 3 項 PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes 形成時の CyDs 濃度の影響

Fig. 34 は、PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の収率に対する CyD 濃度の影響を示す。 α - および γ -CyD いずれの系においても、polypseudorotaxanes の収率は CyD 濃度の上昇に伴い増大し、 α -CyD 145 mg/mL で 75%、 γ -CyD 232 mg/mL で 84% に達した。Polypseudorotaxanes 沈殿が観察される最低 CyD 濃度は、 γ -CyD に比べて α -CyD の方が低いことから、PEG 化リゾチーム中の PEG 鎖との相互作用は、 α -CyD の方が γ -CyD に比べて大きいものと考えられる。

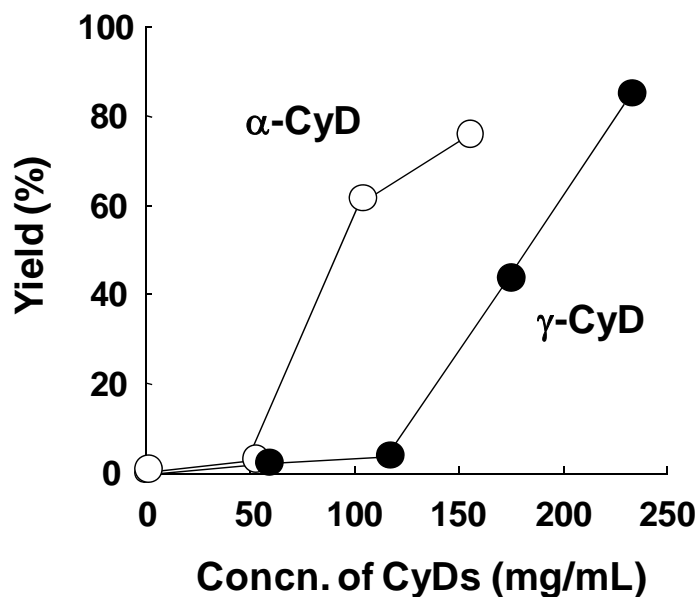


Fig. 34. Changes in Yield of PEGylated Lysozyme/CyD Polypseudorotaxanes as a Function of CyD Concentrations

○: α -CyD, ●: γ -CyD.

第 4 項 粉末 X 線回折

Fig. 35 は PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の粉末 X 線回折図を示す。 α -CyD と PEG 化リゾチームとの物理的混合物は、 α -CyD 単独の場合と同様に、かご型構造 (Fig. 9) に特徴的な回折パターンを示した。一方、PEG 化リゾチーム/ α -CyD polypseudorotaxane は、 $2\theta = 7.40, 12.9, 15.9, 19.8$ および 22.6° に回折ピークを与え、この回折パターンは PEG/ α -CyD polypseudorotaxane の六方晶系筒型構造 (Fig. 11a) の回折パターンと同じであった。⁶³⁻⁶⁶⁾ また、 γ -CyD 系においても、 γ -CyD 単独や γ -CyD と PEG 化リゾチームとの物理的混合物はかご型構造に特徴的な回折パターンを示した。一方、PEG 化リゾチーム/ γ -CyD polypseudorotaxane は、 $2\theta = 7.42, 14.8, 15.8, 16.6$ および 21.6° に回折ピークを与え、この回折パターンは PEG/ γ -CyD polypseudorotaxane の立方晶系筒型構造 (Fig. 11b) の回折パターンと同じであった。⁶³⁻⁶⁶⁾ これらの結果は、 α - および γ -CyD が PEG 化リゾチームの PEG 鎖を優位に包接し、polypseudorotaxanes を形成することを示唆する。

結晶内充填様式の詳細を明らかにするため、 α - および γ -CyD polypseudorotaxanes の回折パターンをそれぞれ六方晶系および立方晶系と仮定し、第 1 章 3 節 4 項と同様に Takeo らの方法^{63, 64)} に準じて、各回折線の指数配当を行った。各 (200) 回折線の d_{obs} から a 軸および b 軸を決定したところ、それぞれ、 $a = b = 27.59 \text{ \AA}$ および $a = b = 23.83 \text{ \AA}$ と算出され、これらの値を用いて、式 (2) および式 (3) から格子面間隔の計算値 d_{cal} を算出した。Table 9 は、PEG 化リゾチーム/ α - および γ -CyD polypseudorotaxanes の回折線の指数配当を行った結果を示す。いずれの系においても、全ての面指数 (hkl) で d_{obs} と d_{cal} がよく一致したことから、 α - および γ -CyD polypseudorotaxanes は、結晶内においてそれぞれ六方晶系および立方晶系の筒型構造を有するものと推察される (Fig. 11)。

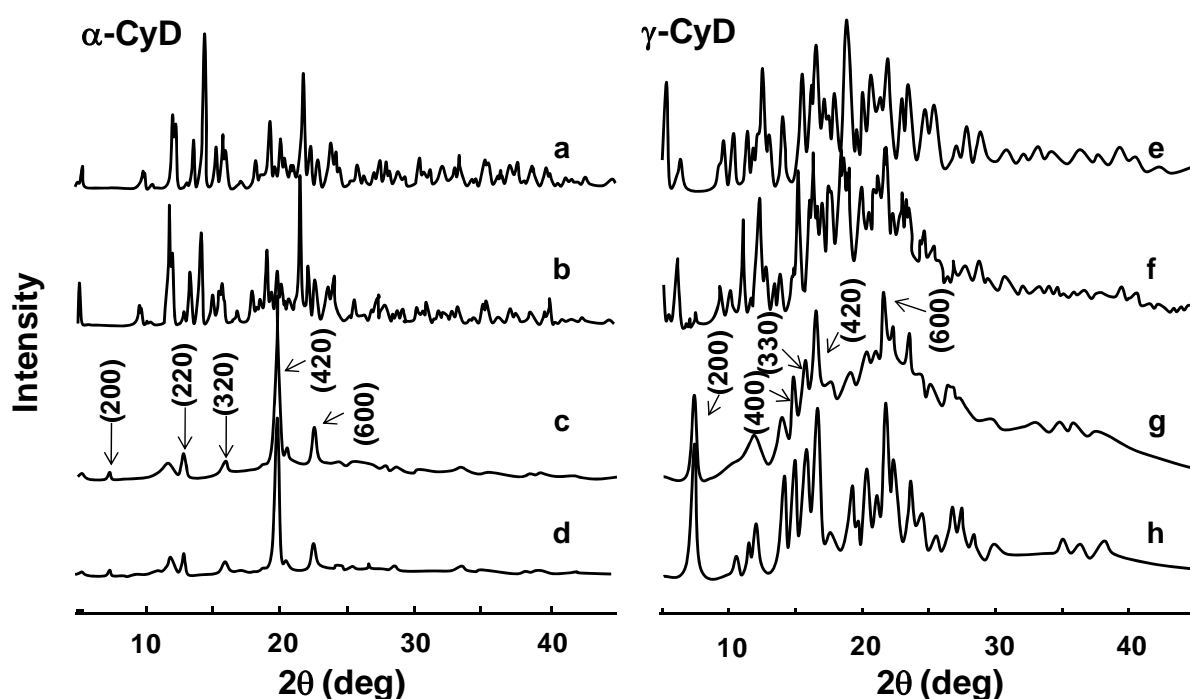


Fig. 35. Powder X-ray Diffraction Patterns of PEGylated Lysozyme/CyD Polypseudorotaxanes

- | | |
|---|---|
| a) α -CyD | e) γ -CyD |
| b) PEGylated lysozyme/ α -CyD physical mixture | f) PEGylated lysozyme/ γ -CyD physical mixture |
| c) PEGylated lysozyme/ α -CyD polypseudorotaxane | g) PEGylated lysozyme/ γ -CyD polypseudorotaxane |
| d) PEG/ α -CyD polypseudorotaxane | h) PEG/ γ -CyD polypseudorotaxane |

Table 9. Crystallographic Characteristics of PEGylated Lysozyme/CyD Polypseudorotaxanes

<i>α-CyD polypseudorotaxane</i>				<i>γ-CyD polypseudorotaxane</i>			
2 θ (deg)	(hkl)	d _{obs} (Å)	d _{cal} ¹⁾ (Å)	2 θ (deg)	(hkl)	d _{obs} (Å)	d _{cal} ²⁾ (Å)
7.40	(200)	11.95	11.95	7.42	(200)	11.91	11.91
12.90	(220)	6.86	6.90	14.80	(400)	5.99	5.96
15.92	(320)	5.57	5.48	15.76	(330)	5.62	5.62
19.84	(420)	4.48	4.52	16.56	(420)	5.35	5.33
22.56	(600)	3.94	3.98	21.64	(600)	4.11	3.97

1) Calculated assuming a hexagonal unit cell with $a = b = 27.59$ Å, packing diameter 11.95 Å.

2) Calculated assuming a tetragonal unit cell with $a = b = 23.83$ Å, packing diameter 11.91 Å.

第 5 項 化学量論比の算出

本項では、PEG 化リゾチーム中の PEG 鎖 1 本に対する CyD 貫通数を求めるため、CyD/PEG 化リゾチーム混合比と polypseudorotaxane 収率の関係を検討した。さらに、¹H-NMR スペクトル法による polypseudorotaxanes の組成分析を行った。

Fig. 36 は、polypseudorotaxane 収率におよぼす CyD/PEG 化リゾチーム混合比 (モル比) の影響を示す。 α -CyD 系において、polypseudorotaxane 収率は、CyD/PEG 化リゾチーム混合比の増加に伴い直線的に増大し、混合比が約 20 でプラトーに達した。一方、 γ -CyD は混合比約 10 でプラトーに達した。これらの結果は、 α - および γ -CyD が PEG 化リゾチームとそれぞれモル比 20/1 および 10/1 で polypseudorotaxanes を形成することを示唆する。

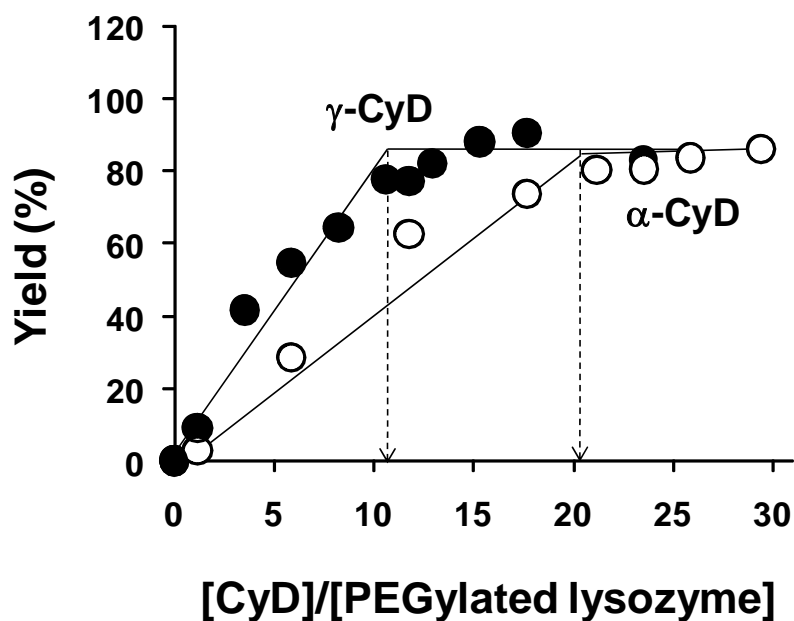


Fig. 36. Changes in Yield of PEGylated Lysozyme/ α -CyD (○) and γ -CyD (●) Polypseudorotaxanes as a Function of [CyD]/[PEGylated Lysozyme]

次に、polypseudorotaxane の化学量論比を明らかにするため、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル法による組成分析を行った。Fig. 37 は PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes を DMSO に溶解後の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。4.8 ppm 付近に CyD 1 位のプロトン、3.5 ppm 付近に PEG のプロトン、6.5~9.0 ppm 付近にリゾチームの芳香族アミノ酸残基のプロトンに由来するピークが観察された。CyD および PEG のプロトンピークの積分値を比較した結果、PEG 化リゾチーム中の PEG 鎖 1 本に α - および γ -CyD はそれぞれ 21.9 個 (貫通率 95%) および 11.7 個 (貫通率 51%) 貫通していることが明らかとなった (Table 10)。これらの値は、Fig. 36 の結果とよく一致した。 γ -CyD polypseudorotaxane の貫通率および CyD 数は α -CyD polypseudorotaxane の約半分であることから、Fig. 32 に示すように、 α -CyD は PEG 化リゾチームの PEG 鎖 1 本、 γ -CyD は PEG 鎖 2 本と polypseudorotaxanes を形成するものと考えられる。

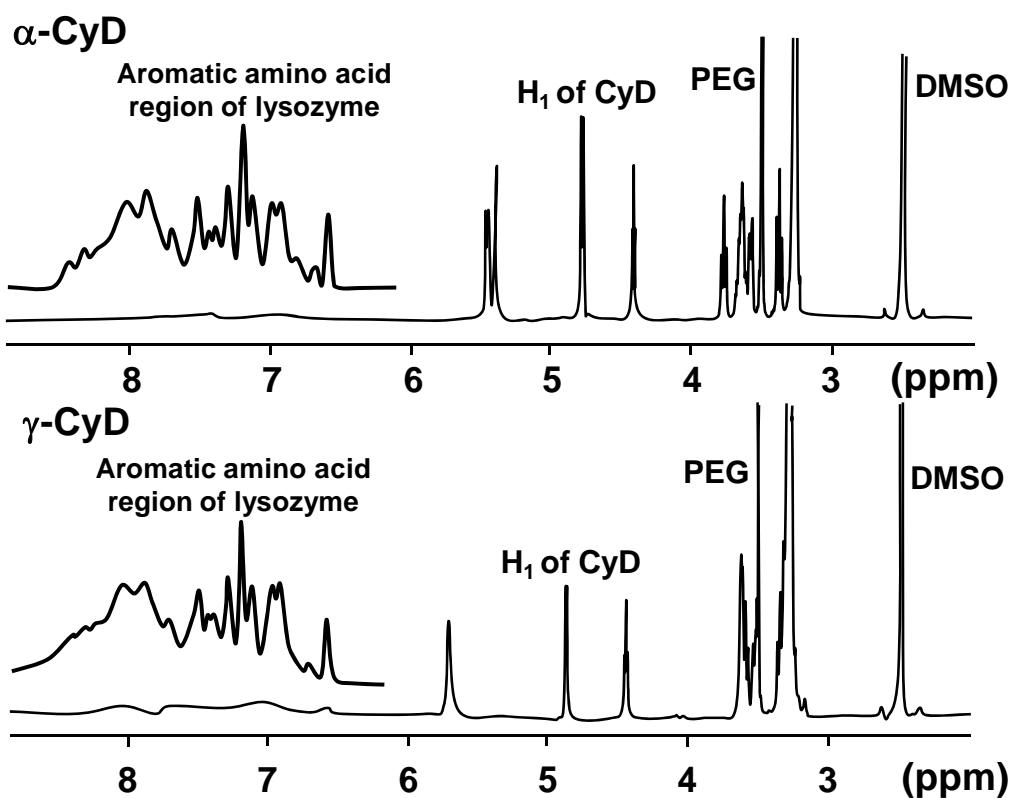


Fig. 37. $^1\text{H-NMR}$ Spectra of PEGylated Lysozyme/CyD Polypseudorotaxanes in $\text{DMSO-}d_6$ at 25°C

Table 10. Compositions of PEGylated Lysozyme/CyD Polypseudorotaxanes

Protein	CyD	Yield (%)	CyD _{number} ¹⁾	Coverage ²⁾ (%)
Lysozyme	α -CyD	74.8	21.9	95.2
	γ -CyD	84.1	11.7	50.9

1) Number of total CyD units in the polypseudorotaxane.

2) Coverage = $2 \text{ (CyD per PEG)} / \text{(PEG repeat units)}$, assuming 2 PEG repeat units per CyD.

第 6 項 PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の推定構造

Fig. 38 は、本節第 1-5 項の結果に基づいて推定した PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes の構造を示す。α-CyD は、CyD がスタッキングして出来た空洞チャンネル内に PEG 化リゾチーム中の PEG 鎖 1 本を包接した結晶性 polypseudorotaxane を形成すること、一方、γ-CyD は 2 本の PEG 鎖を包接して結晶性 polypseudorotaxane を形成することが明らかとなった。さらに、α-CyD polypseudorotaxane は六方晶系、γ-CyD polypseudorotaxanes は立方晶系の結晶充填構造を有するものと推定された。また、第 1 章 3 節 6 項に示したように、γ-CyD polypseudorotaxane には分子間あるいは分子内 polypseudorotaxane の構造異性体が存在するものと推定される。

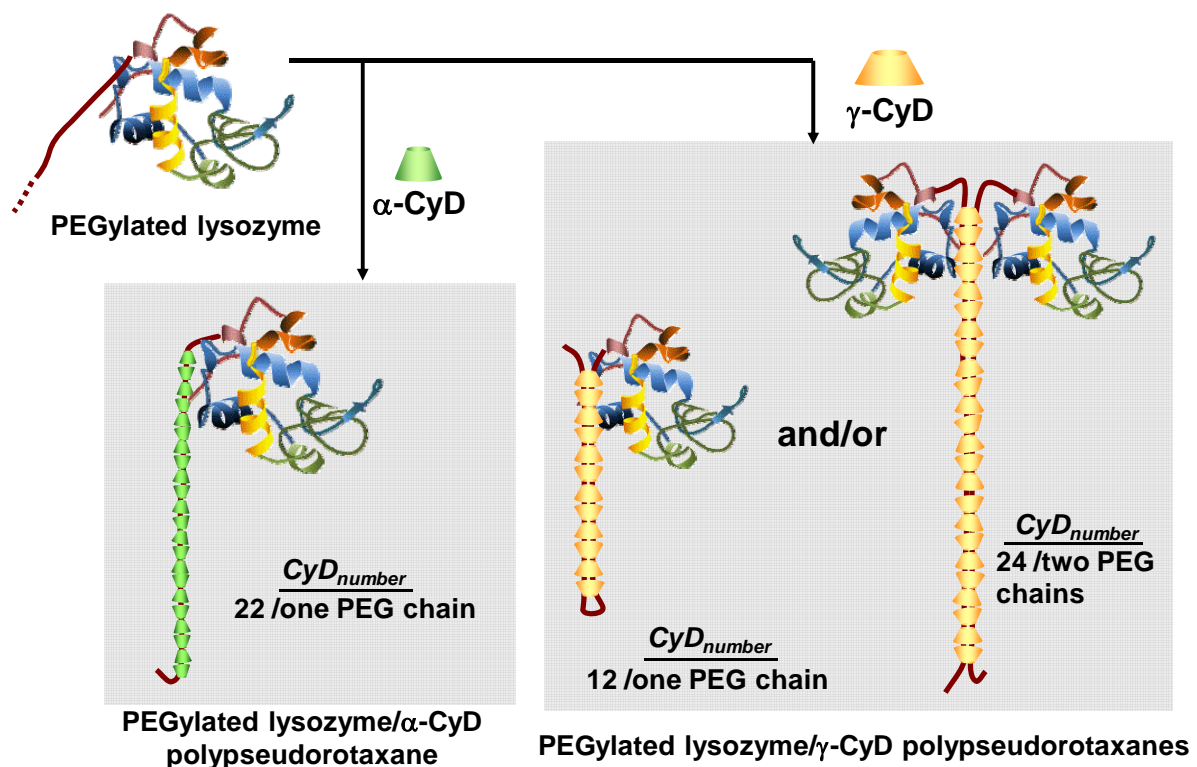


Fig. 38. Proposed Structures of PEGylated Lysozyme/CyD Polypseudorotaxanes

第 4 節 CyD polypseudorotaxane からの PEG 化リゾチームの放出挙動

本節では、CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出挙動を検討した。

Fig. 39 は pH 7.4 リン酸緩衝液中における PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出挙動を示す。PEG 化リゾチーム単独はリン酸緩衝液に速やかに溶解した。一方、CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出は抑制され、放出速度は γ -CyD polypseudorotaxane > α -CyD polypseudorotaxane の順に遅延した。これは、Fig. 34 で考察したように、PEG 化リゾチーム中の PEG 鎖と γ -CyD との相互作用が α -CyD に比べて小さいこと、また、 α -CyD 系 (六方晶系) と γ -CyD 系 (立方晶系) の結晶充填様式の違いなどが溶解速度に反映されたものと考えられる。⁶⁶⁾ 以上の結果から、CyD polypseudorotaxanes は PEG 化リゾチームの放出を抑制し、その放出速度は CyDs の種類により制御可能なことが示唆された。

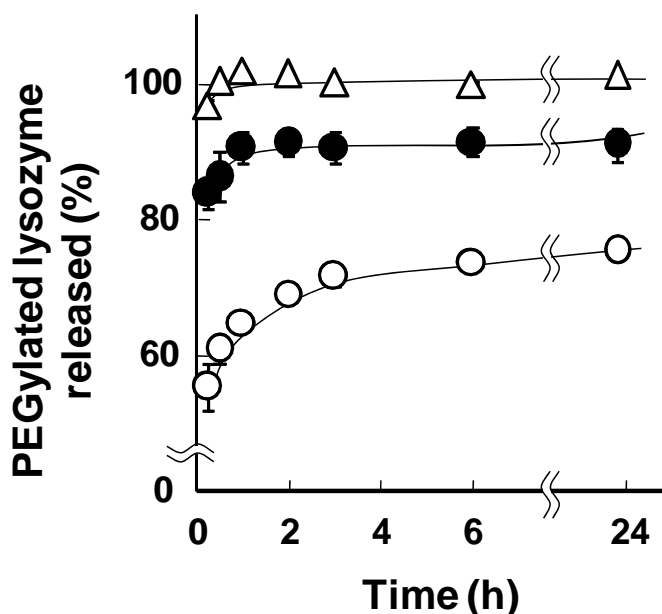


Fig. 39. *In Vitro* Release Profiles of PEGylated Lysozyme from CyD Polypseudorotaxanes¹⁾ in Phosphate Buffer (pH 7.4, 1.0 mL) at 37°C

○: α -CyD polypseudorotaxane, ●: γ -CyD polypseudorotaxane, △: PEGylated lysozyme alone. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

1) The amount of PEGylated lysozyme was 0.1 μ mol.

第 5 節 CyD polypseudorotaxanes から放出後の PEG 化リゾチームの酵素活性

本節では、CyD polypseudorotaxanes から放出後の PEG 化リゾチームの酵素活性を測定した。

Fig. 40 は、CyD polypseudorotaxanes から 放出 24 時間後における PEG 化リゾチームの溶菌活性を示す。なお、溶菌活性は、Kumagai らの方法⁸²⁾ に従い、被験液 (リゾチーム 278 U/mL 相当量を含む放出液 450 μ L) に *M. lysodeikticus* 細胞 (1 mg/mL、50 μ L) を添加し、溶菌に伴う 2 分後の 540 nm における濁度変化を指標に評価した。また、PEG 化リゾチーム単独ならびに CyD polypseudorotaxanes から放出された PEG 化リゾチームの溶菌活性は、リゾチーム単独の溶菌活性に対する相対活性で表した。一般に、タンパク質を PEG 化すると、タンパク質の周りに水和層が形成され、受容体などへの結合が阻害される結果、*in vitro* 活性は低下するといわれている。⁸³⁾ Fig. 40 から明らかなように、PEG 化リゾチームはリゾチーム単独の約 80% の溶菌活性を保持していた。 α - および γ -CyD polypseudorotaxane から放出された PEG 化リゾチームも、PEG 化リゾチーム単独の場合と同様に約 80% の溶菌活性を保持し、活性の低下は観察されなかった。これらの結果は、CyD polypseudorotaxanes から放出された PEG 化リゾチームは PEG 化リゾチーム単独と同等の溶菌活性を保持することを示し、CyDs 濃度を変化すると polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出速度が変化し、溶菌活性の持続化が可能なことを示唆する。

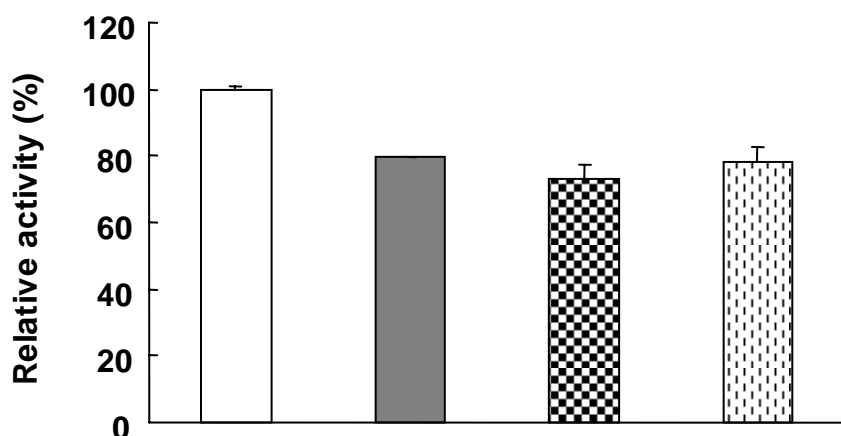






Fig. 40. Lytic Activities of Lysozyme or PEGylated Lysozyme (0.36 μ M) Released from CyD Polypseudorotaxanes to *M.lysodeikticus* Cells (0.1 mg/mL) in Phosphate Buffer (pH 6.5, $I = 0.03$) at 25°C

- | | | | |
|---|---|---|---|
|  | : Lysozyme alone, |  | : PEGylated lysozyme alone, |
|  | : Released PEGylated lysozyme
from α -CyD polypseudorotaxane, |  | : Released PEGylated lysozyme
from γ -CyD polypseudorotaxane. |

Each column represents the mean \pm S.E. of 3-5 experiments.

第 6 節 小括

本章では、PEG 化リゾチームおよびその CyD polypseudorotaxanes を調製し、polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出挙動ならびに放出後の PEG 化リゾチームの酵素活性を比較検討した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) リゾチームに mPEG-OSu を反応させて PEG 鎖 1~2 本が結合した PEG 化リゾチーム (一置換体の含有率約 80%、PEG の平均置換度約 0.85) を調製した。
- 2) α - および γ -CyD 水溶液に PEG 化リゾチームを添加し、4°C で 12 時間静置すると、PEG 化リゾチーム/ α - および γ -CyD polypseudorotaxanes が沈殿した。Polypseudorotaxane の収率は、CyD 濃度の上昇に伴い増大し、 α -CyD 145 mg/mL で 75%、 γ -CyD 232 mg/mL で 84% に達した。
- 3) PEG 化リゾチーム/ α - および γ -CyD polypseudorotaxanes 沈殿物の粉末 X 線回折パターンの解析より、 α - および γ -CyD は PEG 化リゾチーム中の PEG 鎖を包接し、polypseudorotaxanes を形成すること、さらに、 α -CyD および γ -CyD polypseudorotaxanes は結晶内においてそれぞれ六方晶系および立方晶系筒型構造を有することが明らかとなった。¹H-NMR スペクトルを用いた CyD polypseudorotaxane の化学量論比の検討結果より、 α -CyD は PEG 化リゾチームの PEG 鎖 1 本と、一方 γ -CyD は PEG 鎖 2 本と polypseudorotaxane を形成することが推定された。また、その際、 γ -CyD polypseudorotaxane には分子間あるいは分子内 polypseudorotaxane の構造異性体が存在するものと推察される。
- 4) CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出は抑制され、放出速度は γ -CyD polypseudorotaxane > α -CyD polypseudorotaxane の順に遅延した。また、CyD polypseudorotaxanes から放出される PEG 化リゾチームは PEG 化リゾチーム単独と同等の溶菌活性を保持していた。

以上の知見から、PEG 化リゾチーム/CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出速度は、CyDs の種類により制御可能であり、さらに、放出された PEG 化リゾチームは PEG 化リゾチーム単独と同等の酵素活性を保持することが示唆された。これらの結果は、polypseudorotaxanes からの PEG 化リゾチームの放出速度を CyDs の添加濃度で制御することにより、溶菌活性の持続化が可能であることを示唆する。さらに、第 1 章で示したように、CyD polypseudorotaxanes は PEG 化インスリンの制御放出システムとしても有用であることから、本システムは種々のタンパク質性薬物に対して適応可能であることが期待される。

総括

タンパク質性薬物の溶解性、安定性、免疫原性、血中滞留性など様々な製剤学的特性を改善するため、それらの PEG 化に関する研究が活発に行われている。一方、本研究で対象とした CyDs は PEG と高次包接複合体を形成し、難水溶性 polypseudorotaxane を与えることが知られている。そこで本研究では、polypseudorotaxane 形成により PEG 化タンパク質の溶解性を制御し、持続性に優れたタンパク質製剤の構築を企図した。モデルタンパク質にインスリンとリゾチームを用いて、PEG 化タンパク質およびそれらの CyD polypseudorotaxanes を調製し、polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質の放出挙動ならびに放出後の PEG 化タンパク質の高次構造や生理活性を検討した。さらに、PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxanes をラットに皮下投与し、血漿中インスリン濃度および血糖降下作用の持続効果について詳細な検討を行った。

以下に本研究で得られた知見を総括する。

- 1) モデルタンパク質に mPEG-OSu を反応させて、PEG 鎖が約 1 本が結合した PEG 化インスリンおよび PEG 化リゾチームを調製した。各タンパク質に導入された PEG 鎖の置換度は MALDI-TOF Mass スペクトル、HPLC 分析から算出した。
- 2) α - および γ -CyD 水溶液に PEG 化タンパク質を添加し、4°C で 12 時間静置すると、PEG 化タンパク質/ α - および γ -CyD polypseudorotaxanes の結晶性沈殿物が形成された。一方、 β -CyD はこれら PEG 化タンパク質と難水溶性の polypseudorotaxane を形成しなかった。
- 3) PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxanes 沈殿物の FT-IR スペクトルおよび粉末 X 線回折パターンから、 α - および γ -CyD が PEG 化タンパク質の PEG 鎖を包接して CyD polypseudorotaxanes を形成すること、さらに、 α -CyD および γ -CyD polypseudorotaxanes は結晶内においてそれぞれ六方晶系および立方晶系筒型構造を有するものと推定された。また、CyD polypseudorotaxanes の化学量論比から、 α -CyD

は PEG 化タンパク質の PEG 鎖 1 本と、一方 γ -CyD は PEG 鎖 2 本と polypseudorotaxanes を形成するものと推定された。さらに、end-capped PEG 誘導体を用いた polypseudorotaxane 形成、 γ -CyD polypseudorotaxane の収率におよぼす γ -CyD 水溶液量の影響を検討した結果、空洞径が大きな γ -CyD は、PEG 化タンパク質 2 分子の PEG 鎖が平行に並んで包接された分子間 polypseudorotaxane のみならず、PEG 化タンパク質 1 分子中の PEG 鎖が折れ曲がって包接された分子内 polypseudorotaxane も形成する可能性が示唆された。

- 4) CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質の放出は抑制され、放出速度は PEG 化タンパク質 \gg γ -CyD polypseudorotaxane $>$ α -CyD polypseudorotaxane の順に遅延した。Polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質の放出速度は、溶出溶媒量の減少、溶媒中の遊離 CyD 濃度の上昇、タンパク質分子への PEG 導入数の増大に伴い抑制された。さらに、PEG 化インスリンの CD スペクトルおよび PEG 化リゾチームを用いた溶菌活性の測定結果から、CyD polypseudorotaxanes から放出された PEG 化タンパク質は PEG 化タンパク質単独と同様の高次構造および酵素活性を保持し、生理活性に影響をおよぼさないことが示唆された。
- 5) PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane をラット背部に皮下投与すると、血漿中インスリン濃度や血糖降下作用はインスリンや PEG 化インスリン単独投与に比べて有意に増大するとともに、顕著な持続効果が観察された。この理由として、 γ -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出速度が適切であったこと、 γ -CyD polypseudorotaxane 形成により PEG 化インスリンの酵素安定性が向上したことなどが推定された。一方、 α -CyD polypseudorotaxane をラット背部に皮下投与しても、血漿中インスリン濃度の上昇および血糖降下作用はほとんど観察されなかった。この理由として、 α -CyD polypseudorotaxane からの PEG 化インスリンの放出が極めて遅いため、血漿中 PEG 化インスリン濃度が不十分であること、インスリンの吸収や活性に対する α -CyD 自身の影響などが考えられた。これらの結果は、CyD の種類、CyD polypseudorotaxanes を希釈する溶媒中の CyD 濃度を調節することにより、PEG 化イ

ンスリンの放出速度を制御可能なことを示唆する。

- 6) PEG 化インスリン/ γ -CyD polypseudorotaxane は市販の持続性インスリン製剤に比べて血糖降下作用を若干遅延した。

以上の知見から、PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質の放出速度は、CyDs の種類あるいは添加 CyD 濃度を調節することにより制御可能であり、これら polypseudorotaxanes は持続性タンパク質製剤の構築に有用なことが示唆された。現在、様々な PEG 化タンパク質性薬物を用いた薬効の持続化、免疫原性の軽減、化学的・物理化学的安定性の改善が行われ、臨床使用例も増加している。本 polypseudorotaxane システムは、PEG 化タンパク質薬物の物理化学的・生物学的性質あるいは製剤特性を改善する上で、以下の点から、極めて実用性に富む制御放出システムであると考えられる。

- ① Polypseudorotaxane 形成により: 1) 水溶性 PEG 化タンパク質性薬物の放出速度を制御できる。 2) PEG 化タンパク質性薬物の化学的・物理的・酵素安定性を改善することができる。 3) 油状あるいは半固形状態の PEG あるいは PEG 化タンパク質性薬物の固化が可能である。 4) タンパク質性あるいは低分子薬物の PEG 化反応において、polypseudorotaxane の沈澱形成を利用して、未修飾体から PEG 化修飾体を選択的に分離できる。
- ② Polypseudorotaxane 形成は: 1) 調製が簡便であり、高収率である。 2) 有機溶媒を用いないため、安全性に優れる。 3) CyDs の安全性は確立されており、臨床使用例も多い。 4) CyDs は比較的安価である。 5) 理論上全ての PEG 化タンパク質に適用可能である。 6) 他のタンパク質性薬物のみならず低分子の PEG 修飾体あるいは、PEG 化 DDS キャリア (マイクロスフェア、リポソームなど) にも応用可能である。

本研究で得られた polypseudorotaxanes 形成に関する知見は、PEG 化タンパク質性薬物の皮下注射時の持効化のみならず、他の剤形への応用を企図する際の有用な基礎資料になるものと考えられる。とりわけ、PEG 化タンパク質性薬物は CyD polypseudorotaxane

化により微粉化し、酵素安定性も著しく改善されることから、粉末吸入剤 (Dry powder inhaler, DPI) やエアゾール剤への応用が期待される。さらに、CyD polypseudorotaxanes は難水溶性であることから、PEG 化タンパク質と非 PEG 化タンパク質を分離する手法としての応用も期待される (Fig. 41)。すなわち、未精製の PEG 化反応物に CyD 水溶液を添加すると、非 PEG 化タンパク質は上清に溶解するのに対して、PEG 化タンパク質は polypseudorotaxane 化により沈殿するものと予想される。実際、ランダムに 1-2 本の PEG 鎖を導入した PEG 化インスリンを用いて α -CyD との polypseudorotaxane を一定条件下で調製し、生成した沈殿物中のインスリンの組成を HPLC で測定すると、PEG 化インスリンの大部分は沈殿物中に存在することが明らかとなった (PEG 化タンパク質純度 > 95%) (Fig. 42b)。一方、非 PEG 化インスリンの大部分は、上清の溶液中に溶解していることが確認された (Fig. 42c)。これらの結果は、CyD polypseudorotaxane 形成を利用して PEG 化薬物 (低分子～タンパク質などの高分子) と非 PEG 化薬物の分離が可能なことを示すものであり、PEG 化タンパク質の新規精製法としての応用が期待される。

このように、タンパク質性薬物に分子ネックレス (polypseudorotaxanes) 機能を付加することで、今後様々な用途が拡大するものと考えられる。

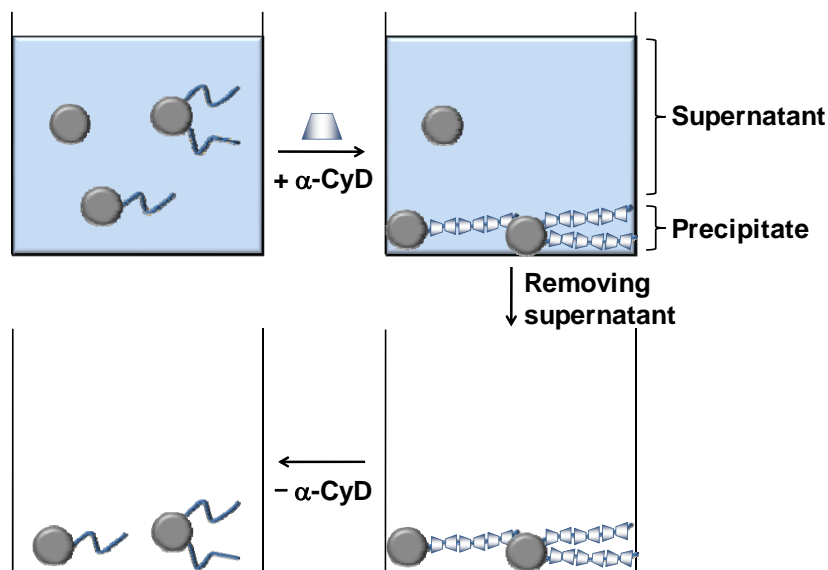


Fig. 41. Proposed Scheme for Purification System of PEGylated Proteins Utilizing Polypseudorotaxane Formation

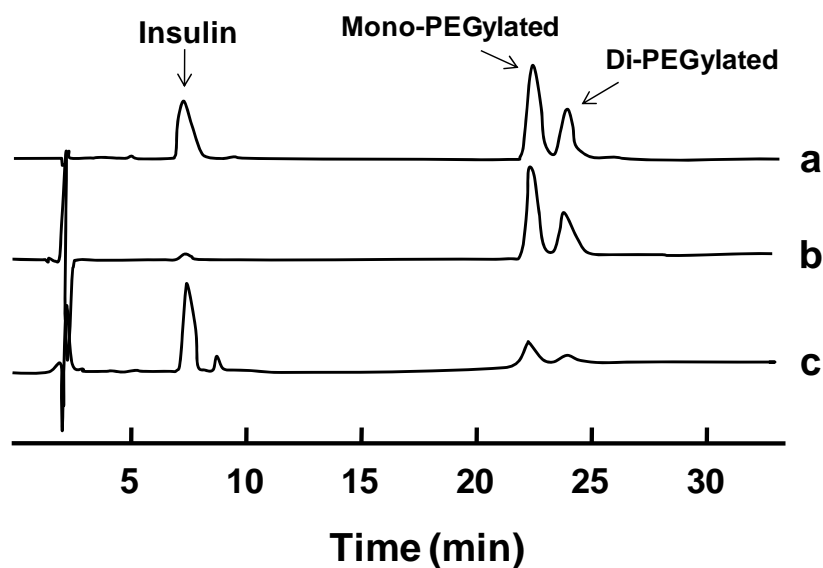


Fig. 42. HPLC Chromatograms of Intact Insulin and Randomly PEGylated Insulin

- a) Solution containing intact insulin and randomly PEGylated insulin,
- b) Precipitates after formation of α -CyD polypseudorotaxane,
- c) Supernatant after formation of α -CyD polypseudorotaxane.

謝 辞

本研究を行うに際して終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部製剤設計学分野 有馬英俊 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際して御懇篤なる御指導と御助言を賜りました、崇城大学薬学部製剤学研究室 上釜兼人 教授、平山文俊 教授、熊本大学大学院医学薬学研究部製剤設計学分野 本山敬一 助教に深く感謝の意を表します。

本論文作成に当たり有益なる御助言と御校閲を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部 小田切優樹 教授、入江徹美 教授、今井輝子 教授に深く感謝の意を表します。

MALDI-TOF Mass 測定に当たり御便宜と御助力を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部 三隅将吾 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益なる御助言と御協力を賜りました協和発酵キリン株式会社 Sumitra Tavornvipas 博士、大日本住友製薬株式会社 銚之原和博 氏に深く感謝の意を表します。

ドイツでの半年間にわたる海外研修を支えてくださいましたエボニックデグサジャパン株式会社 三井 浩 氏、森田貴之 氏、石井達弥 氏、古川晴子 氏および友人である Mr. Kevin P.O' Donnell、Mr. Diego Gallardo、Mr. Hans Bär、Mr. Hofmann Felix に深く感謝致します。

本研究にご協力頂いた東レ株式会社 堀内保秀 博士、サノフィ・アベンティス株式会社 上畑恵子 氏、崇城大学薬学部製剤学研究室 庵原大輔 助教、中外製薬株式会社 山下正悟 氏ならびに当研究室の諸氏に深く感謝の意を表します。

私の研究室生活ならびに学生生活を有意義かつ刺激的にしてくださいました当研究室同期の皆様ならびにフジオ☆クラブ部員の皆様に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、ご支援ご協力くださいました財団法人日本科学協会 (笹川科学研究助成金) に感謝致します。

最後に、私の学生生活および研究活動を温かく見守って頂いた家族ならびに友人にこの場を借りて感謝致します。

平成 21 年 3 月

実験の部

1. 試料および試薬

インスリン (27.5 U/mg) およびリゾチーム (58100 U/mg) は Sigma 社製を用いた。 α -CyD、 β -CyD および γ -CyD は日本食品加工 (株) から恵与されたものを用いた。SUNBRIGHT® ME-020 CS (mPEG-OSu) は日本油脂 (株) 製のものを用いた。PEG-bis amine (M.W. = 2000) は、川研ファインケミカル (株) から恵与されたものを用いた。Succinimidyl-Z-benzyloxycarbonyl L-phenylalanine (Zphe-OSu) は国産化学 (株) 製のものを用いた。その他の試薬および溶媒は市販特級品を用いた。溶媒としての水はイオン交換精製水を 2 回蒸留して用いた。

2. PEG 化タンパク質の調製

2-1. Mono-PEG 化インスリンの調製

Lee らの方法に準じて合成した。⁴⁷⁾ インスリン 20 mg を、DMF/水 (3:2 v/v) 混液 1.2 mL に懸濁後、1 N 水酸化ナトリウムを用いて pH 10 に調整した。これに、DMF 0.2 mL に溶解した mPEG-OSu 12 mg を添加し、pH 10 に保ったまま室温で 10 分間攪拌した。水 3.6 mL を加え反応を停止させ、1 N 塩酸で pH 2 に調整した後、透析 (Spectra/Por® Membrane MWCO: 3500) により未反応の mPEG-OSu を除去した。その後、凍結乾燥により得られた粉末を水に溶解し、HPLC を用いて精製した。Mono-PEG 化インスリンを含む画分は凍結乾燥した (収率 45%、純度 > 99%)。

HPLC 条件 は以下の通りである。ポンプ: 島津 (株) 製 LC-10AD 形、検出器: 日本分光 (株) 製 UVDEC 100 V-UV 形、測定波長: 280 nm、カラム: (株) ワイエムシイ製 YMC Pack C₁₈ AP-type (4.6 mm i.d. x 150 mm)、移動相: A 液; アセトニトリル:水:トリフルオロ酢酸 = 30:69.9:0.1、B 液; アセトニトリル:水:トリフルオロ酢酸 = 95:4.9:0.1、B 液グラジエント: 0~100%/60 min、流速: 1.0 mL/min。

2-2. Multi-PEG 化インスリンの調製

Kim らの方法に準じて合成した。⁴⁸⁾ インスリン 14 mg を DMSO 1 mL に溶解後、

mPEG-OSu 12 mg を加え、室温で 5 時間攪拌した。水 4 mL を加え反応を停止させた後、水で透析 (Spectra/Por[®] Membrane MWCO: 3500) し、凍結乾燥した。

2-3. PEG 化リゾチームの調製

Yamasaki らの方法に準じて合成した。⁸⁰⁾ リゾチーム 40 mg を、100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 4 mL に溶解後、mPEG-OSu 20 mg を加え、4°C で 12 時間攪拌した。反応液を水で透析 (Spectra/Por[®] Membrane MWCO: 3500) 後、凍結乾燥した。

3. PEG 化タンパク質の分子量および組成

3-1. MALDI-TOF Mass スペクトル測定

試料を Millipore 社製 ZipTip[®] C18 を用いて脱塩精製し、Bruker 社製 REFLEX[™] MALDI-TOF Mass を用いて測定した。測定条件は以下の通りである。検出システム: リニアモード、極性: 正イオンモード、マトリックス: シナピン酸、レーザー光源: 337 nm N₂ レーザー、照射回数: 100 以上。

3-2. HPLC

PEG 化インスリンは、先述の HPLC 装置および条件で測定した。PEG 化リゾチームの分析は、カラムに GL Sciences 社製 Nucleosil C₁₈ (4.0 mm i.d. x 250 mm) を用い、他の装置および測定条件はインスリンの場合と同様である。

4. PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxanes の調製

Harada らの方法に準じて調製した。²¹⁾ α-CyD 水溶液 (145 mg/mL) 0.148 mL あるいは γ-CyD 水溶液 (232 mg/mL) 0.062 mL に、PEG 化タンパク質 (PEG 鎖に対して 1 μmol) 水溶液 0.050 mL を添加し、4°C で 12 時間静置した。

5. PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxane の構造

5-1. FT-IR スペクトル

上記調製物を水で 2 回洗浄後、減圧乾燥することにより PEG 化タンパク質/CyD

polypseudorotaxane の固体試料を得た。各固体試料の FT-IR スペクトルは、KBr 法により測定錠剤を調製後、日本分光製 JIR-6500W FT-IR 分光計を用いて測定した。測定条件は以下の通りである。測定波数: 4000~400 cm^{-1} 、解像度: 4 cm^{-1} 、スキャン: 32 scans。

5-2. 粉末 X 線回折

粉末 X 線回折は理学電機 (株) 製 RINT 2500VL 型自動粉末 X 線回折装置を使用し、試料をガラスセルに固定して測定した。測定条件は以下の通りである。X 線源: Cu-K α 線 (1.542 Å)、管電圧: 40 kV、管電流: 40 mA、走査速度: 1°/min、回折角: 5~45°、スリット: 1°-1°-0.15 mm。

5-3. $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxane の固体試料を DMSO- d_6 に溶解し (2% (w/v))、日本電子 (株) 製 JNM- α -500 型核磁気共鳴装置 (外部磁場 : 500 MHz) を用いて 25°C で測定した。

5-4. Zphe₂-PEG およびその CyD polypseudorotaxane の調製

Yui らの方法に準じて調製した。⁸⁴⁾ PEG-bis amine (M.W. = 2000、200 mg) および過剰量の Zphe-OSu (198 mg) を 2 mL DMF に溶解後、室温で 24 時間攪拌した。反応溶液を過剰量のジエチルエーテルに添加し、得られた沈殿物を濾取した。さらにジエチルエーテルで 3 回洗浄後、減圧乾燥した。なお、調製物の FAB Mass スペクトルは、日本電子製 JMS-DX 303 質量分析計により測定した。測定条件は以下の通りである。溶媒: DMSO、マトリックス: グリセロール、正イオンモード。また、TLC 実験条件は以下の通りである。TLC プレート: シリカゲル (Merck F₂₅₄)、展開溶媒: クロロホルム/メタノール = 5:1、指示薬: ヨウ素。

6. PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxanes からの PEG 化タンパク質放出実験

pH 7.4 リン酸緩衝液中に、PEG 化タンパク質 1 μmol を含む CyD polypseudorotaxane を調製し、さらに各量 (1.00、0.85、0.45 mL) のリン酸緩衝液もしくは各濃度の CyD 含有リン酸緩衝液 1 mL を添加して混和後、37°C で保温した。遠心分離した試料の上清 50 μL を経時的に採取し、HPLC を用いて CyD polypseudorotaxane から放出した PEG 化タンパク質を定量した。

7. PEG 化タンパク質/CyD polypseudorotaxane から放出後の PEG 化タンパク質の高次構造および *in vitro* 活性

7-1. CD スペクトル

HPLC を用いて CyD polypseudorotaxane から 24 時間後に放出した PEG 化インスリンの濃度を算出し、上澄液を pH 7.4 リン酸緩衝液を用いて PEG 化インスリン濃度を 0.1 mM に調節した。この試料を、日本分光 (株) 製 J-720 型円二色性分散計を用いて 25 °C で測定した。測定には 1 mm セルを使用し、窒素ガス流量 2 L/min、時定数 4 sec、走査速度 10 nm/min で測定した。インスリンの分子楕円率 $[\theta]$ はアミノ酸残基当たりの平均楕円率で表わした。

7-2. 溶菌活性

CyD polypseudorotaxane から 24 時間後に放出した PEG 化リゾチームの濃度を HPLC を用いて算出し、その溶菌活性を Kumagai らの方法に従い測定した。⁸²⁾ リン酸緩衝液 (pH 6.5、 $I = 0.03$) 中、リゾチームもしくは PEG 化リゾチーム (250 U/mL、0.36 μM) を *M. lysodeikticus* 細胞 (Sigma 社製、0.1 mg/mL) とともに、25°C で 2 分間保温した。*M. lysodeikticus* 細胞懸濁液の 540 nm における濁度変化を日立製作所 (株) 製 U-2000 型分光光度計を用いて測定した。各試料の溶菌活性は、リゾチーム単独の濁度減少を 100% とした相対活性で表した。

8. *In vivo* 皮下投与実験

Wistar 系雄ラット (体重 200-250 g) を 12 時間絶食後、ジエチルエーテルを用いて麻酔した。インスリン 0.285 mg/mL もしくは PEG 化インスリン 0.380 mg/mL を含む試料 (PEG 化インスリンは pH 7.4 リン酸緩衝液に溶解したもの、 α - および γ -CyD polypseudorotaxane は各濃度の CyD 含有リン酸緩衝液に懸濁したもの) をラット背部皮下に投与 (インスリン単独は 2 U/kg、PEG 化インスリンおよび CyD polypseudorotaxanes は 3.7 U/kg) 後、経時的に頸静脈より採血した。血漿中インスリン濃度は Glazyme Insulin-EIA Test Wako[®] (和光純薬 (株) 製)、血漿中グルコース濃度は Glucose-CII-Test Wako[®] (和光純薬 (株) 製) により測定した。

9. PEG 化インスリン/CyD polypseudorotaxane の酵素安定性

インスリン、PEG 化インスリンもしくは γ -CyD polypseudorotaxane (インスリンとして 5 mg) を 5 mL のリン酸緩衝液もしくは 232 mg/mL γ -CyD 含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) に希釈し、トリプシン溶液 (1 mg/mL) を 0.05 mL 添加後、37°C、50 rpm で保温した。経時的に採取した試料 0.20 mL を 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液に添加後、前述の HPLC 条件により未分解のインスリンもしくは PEG 化インスリンを定量した。

10. CyD polypseudorotaxane 形成を利用した PEG 化インスリンの選択的分離法の確立

ランダム PEG 化インスリン (平均 PEG 導入数 = 0.98 ; インスリン = 28.8%、mono- 体 = 43.9%、di- 体 = 27.2% を含む) 3.8 mg を 0.4 mL の水に溶解後、145 mg/mL α -CyD 水溶液 10 mL を添加した。室温で 2 時間静置し、生成した沈殿物を遠心分離後 (5000 rpm、5 分間)、上清を除去した。得られた沈殿物を水に溶解し、HPLC により沈殿物中のインスリンおよびランダム PEG 化インスリン量を測定した。上清液中のインスリンおよびランダム PEG 化インスリン量も同様に測定した。

参 考 文 献

- 1) G. M. Fox, S. G. Schiffer, M. F. Rohde, L. B. Tsai, A. R. Banks and T. Arakawa, Production, Biological Activity, and Structure of Recombinant Basic Fibroblast Growth Factor and an Analog with Cysteine Replaced by Serine, *J. Biol. Chem.*, **263**, 18452-18458 (1988).
- 2) D. B. Rifkin and D. Moscatelli, Recent Developments in the Cell Biology of Basic Fibroblast Growth Factor, *J. Cell Biol.*, **109**, 1-6 (1989).
- 3) 稲田祐二, 谷本 剛, バイオコンジュゲート医薬品, 廣川書店, 東京, 1993.
- 4) 高倉善信, 注射タイプの DDS 製剤, *薬局*, **56**, 53-56 (2005).
- 5) 菅谷量俊, 西澤健司, 清水 哲, 村田和也, 平野公晟, 高カロリー輸液バッグ・輸液セットにおけるインスリンの吸着および吸着抑制についての検討, *Pharm Tech Japan*, **9**, 825-830 (1993).
- 6) 横野浩一, 超速効型・超持続型インスリン製剤開発の動向, *日本臨床*, **59**, 2127-2133 (2001).
- 7) R. Bartus, M. Tracy, D. Emerich and S. Zale, Sustained Delivery of Proteins for Novel Therapeutic Products, *Science*, **281**, 1161-1162 (1998).
- 8) G. Chen, Y. Ito and Y. Imanishi, Mitogenic Activities of Water-Soluble and -Insoluble Insulin Conjugates, *Bioconjug. Chem.*, **8**, 106-110 (1997).
- 9) M. Baudys, D. Letourneur, F. Liu, D. Mix, J. Jozefonvicz and S. W. Kim, Extending Insulin Action *In vivo* by Conjugation to Carboxymethyl Dextran, *Bioconjug. Chem.*, **9**, 176-183 (1998).
- 10) J. M. Harris and R. B. Chess, Effect of Pegylation on Pharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 214-221 (2003).

- 11) F. M. Veronese and G. Pasut, PEGylation, Successful Approach to Drug Delivery, *Drug Discov. Today*, **10**, 1451-1458 (2005).
- 12) 山田基之, 稲田祐二, 合成高分子と生体高分子のハイブリッド, *現代化学*, **297**, 62-67 (1995).
- 13) 泉 並木, ペグ・インターフェロン製剤による肝炎の治療, *医学のあゆみ*, **208**, 413-416 (1995).
- 14) W. Saenger, Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 344-362 (1980).
- 15) 上釜兼人, シクロデキストリン Complex の製剤への応用, *薬学雑誌*, **101**, 857-873 (1981).
- 16) 佐藤洋一, 松丸秀夫, 入江徹美, 小田切優樹, 上釜兼人, シクロデキストリン包接によるチアムリン注射時の局所刺激性の改善, *薬学雑誌*, **102**, 874-880 (1982).
- 17) K. Uekama and M. Otagiri, Cyclodextrins in Drug Carrier Systems, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 1-40 (1987).
- 18) 東 大志, 有馬英俊, シクロデキストリンを用いた難水溶性薬物の溶解性改善に関する最近の話題, *ファルマシア*, **42**, 1005-1010 (2006).
- 19) S. Tavornvipas, F. Hirayama, S. Takeda, H. Arima and K. Uekama, Effects of Cyclodextrins on Chemically- and Thermally-induced Unfolding and Aggregation of Lysozyme and Basic Fibroblast Growth Factor, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 2722-2729 (2006).
- 20) S. Tavornvipas, S. Tajiri, F. Hirayama, H. Arima and K. Uekama, Effects of Hydrophilic Cyclodextrins on Aggregation of Recombinant Human Growth Hormone, *Pharm. Res.*, **21**, 2369-2376 (2004).
- 21) A. Harada, J. Li and M. Kamachi, Preparation and Properties of Inclusion Complexes

- of Poly(ethylene glycol) with α -Cyclodextrin, *Macromolecules*, **26**, 5698-5703 (1993).
- 22) A. Harada and M. Kamachi, Complex Formation between Poly(ethylene glycol) and α -Cyclodextrin, *Macromolecules*, **23**, 2821-2823 (1990).
- 23) A. Harada, J. Li and M. Kamachi, The Molecular Necklace: a Rotaxane Containing Many Threaded α -Cyclodextrin, *Nature*, **356**, 325-327 (1992).
- 24) A. Harada, J. Li and M. Kamachi, Double-stranded Inclusion Complexes of Cyclodextrin Threaded on Poly(ethylene glycol), *Nature*, **370**, 126-128 (1994).
- 25) A. Harada, J. Li, S. Suzuki and M. Kamachi, Complex Formation between Polyisobutylene and Cyclodextrin: Inversion of Chain-length Selectivity between β -Cyclodextrin and γ -Cyclodextrin, *Macromolecules*, **26**, 5267-5268 (1993).
- 26) A. Harada, M. Okada, J. Li and M. Kamachi, Preparation and Characterization of Inclusion Complexes of Poly(propylene glycol) with Cyclodextrins, *Macromolecules*, **28**, 8406-8411 (1995).
- 27) A. Harada, Preparation and Structures of Supramolecules between Cyclodextrins and Polymers, *Coord. Chem. Rev.*, **148**, 115-133 (1996).
- 28) H. Jiao, S. H. Goh and S. Valiyaveetil, Inclusion Complexes of Single-C60-End-Capped Poly(ethylene oxide) with Cyclodextrins, *Macromolecules*, **35**, 1399-1402 (2002).
- 29) 原田 明, ロタキサン, *化学*, **53**, 29-31 (1998).
- 30) 下村武史, 赤井智紀, 伊藤耕三, 橋詰富博, 超分子構造を用いた分子被覆導線, *応用物理*, **72**, 1509-1515 (2003).
- 31) A. Harada, J. Li and M. Kamachi, Synthesis of a Tubular Polymer from Threaded

- Cyclodextrins, *Nature*, **364**, 516-518 (1993).
- 32) Y. Okumura and K. Ito, The Polyrotaxane Gel: A Topological Gel by Figure-of-Eight Cross-links, *Adv. Mater.*, **13**, 4875-4877 (2001).
- 33) A. Harada, Cyclodextrin-Based Molecular Machines, *Acc. Chem. Res.*, **34**, 456-464 (2001).
- 34) T. Ooya, A. Yamashita, M. Kurisawa, Y. Sugaya, A. Maruyama and N. Yui, Effects of Polyrotaxane Structure on Polyion Complexation with DNA, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **5**, 363-369 (2004).
- 35) A. Nelson, J. M. Belitsky, S. Vidal, C. S. Joiner, L. G. Baum and J. F. Stoddart, A Self-Assembled Multivalent Pseudopolyrotaxane for Binding Galectin-1, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11914-11922 (2004).
- 36) T. Ooya, M. Eguchi and N. Yui, Supramolecular Design for Multivalent Interaction: Maltose Mobility along Polyrotaxane Enhanced Binding with Concanavalin A, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13016-13017 (2003).
- 37) J. Li, X. Li, X. Ni, X. Wang, H. Li and K. W. Leong, Self-Assembled Supramolecular Hydrogels Formed by Biodegradable PEO-PHB-PEO Triblock Copolymers and α -Cyclodextrin for Controlled Drug Delivery, *Biomaterials*, **27**, 4132-4140 (2006).
- 38) J. Li, C. Yang, H. Li, X. Wang, S. H. Goh, J. L. Ding, D. Y. Wang and K. W. Leong, Cationic Supramolecules Composed of Multiple Oligoethylenimine-Grafted β -Cyclodextrins Threaded on a Polymer Chain for Efficient Gene Delivery, *Adv. Mater.*, **18**, 2969-2974 (2006).
- 39) A. Yamashita, N. Yui, T. Ooya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure and H. Harashima, Synthesis of a Biocleavable Polyrotaxane-Plasmid DNA (pDNA) Polyplex and Its Use for the Rapid Nonviral Delivery of pDNA to Cell Nuclei, *Nat. Protoc.*, **1**, 2861-2869 (2006).

- 40) J. Li and X. J. Loh, Cyclodextrin-Based Supramolecular Architectures: Syntheses, Structures, and Applications for Drug and Gene Delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1000-1017 (2008).
- 41) G. Wenz, B. H. Han and A. Müller, Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes, *Chem. Rev.*, **106**, 782-817 (2006).
- 42) 丸山工作, *新インスリン物語*, 東京化学同人, 東京, 1992.
- 43) 平田幸正, インスリン療法の進展 (効果と便利性), *日本薬剤師会雑誌*, **42**, 1509-1514 (1990).
- 44) 武藤達也, インスリン製剤の吸収部位と体内動態, *薬局*, **55**, 3011-3017 (2004).
- 45) M. L. Brader, M. Sukumar, A. H. Pekar, D. S. McClellan, R. E. Chance, D. B. Flora, A. L. Cox, L. Irwin and S. R. Myers, Hybrid Insulin Cocrystals for Controlled Release Delivery, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 800-804 (2002).
- 46) K. D. Hinds, K. M. Campbell, K. M. Holland, D. H. Lewis, C. A. Piche and P. G. Schmidt, PEGylated Insulin in PLGA Microparticles. *In vivo* and *In vitro* Analysis, *J. Control. Release*, **104**, 447-460 (2005).
- 47) S. Lee, K. Kim, T. S. Kumar, J. Lee, S. K. Kim, D. Y. Lee, Y. K. Lee and Y. Byun, Synthesis and Biological Properties of Insulin-Deoxycholic Acid Chemical Conjugates, *Bioconjug. Chem.*, **16**, 615-620 (2005).
- 48) K. Hinds, J. J. Koh, L. Joss, F. Liu, M. Baudys and S. W. Kim, Synthesis and Characterization of Poly(ethylene glycol)-Insulin Conjugates, *Bioconjug. Chem.*, **11**, 195-201 (2000).
- 49) K. D. Hinds and S. W. Kim, Effects of PEG Conjugation on Insulin Properties, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 505-530 (2002).

- 50) Y. K. Joung, T. Ooya, M. Yamaguchi and N. Yui, Modulating Rheological Properties of Supramolecular Networks by pH-Responsive Double-Axle Intrusion Into γ -Cyclodextrin, *Adv. Mater.*, **19**, 396-400 (2007).
- 51) C. Park, C. K. Oh, S. C. Lee and C. Kim, Controlled Release of Guest Molecules from Mesoporous Silica Particles Based on a pH-Responsive Polypseudorotaxane Motif, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 1455-1457 (2007).
- 52) C. Moon, Y. M. Kwon, W. K. Lee, Y. J. Park and V. C. Yang, *In Vitro* Assessment of a Novel Polyrotaxane-Based Drug Delivery System Integrated with a Cell-Penetrating Peptide, *J. Control. Release*, **124**, 43-50 (2007).
- 53) C. Moon, Y. M. Kwon, W. K. Lee, Y. J. Park, L. C. Chang and V. C. Yang, A Novel Polyrotaxane-Based Intracellular Delivery System for Camptothecin: *In Vitro* Feasibility Evaluation, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **84**, 238-246 (2008).
- 54) H. Utsunomiya, R. Katoono, N. Yui, T. Sugiura, Y. Kubo, Y. Kato and A. Tsuji, Cationic Polyrotaxanes Effectively Inhibit Uptake via Carnitine/Organic Cationic Transporters without Cytotoxicity, *Macromol. Biosci.*, **8**, 665-669 (2008).
- 55) A. Yamashita, D. Kanda, R. Katoono, N. Yui, T. Ooya, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure and H. Harashima, Supramolecular Control of Polyplex Dissociation and Cell Transfection: Efficacy of Amino Groups and Threading Cyclodextrins in Biocleavable Polyrotaxanes, *J. Control. Release*, **131**, 137-144 (2008).
- 56) 緒方直哉, 寺野 稔, 由井伸彦, 機能性超分子, シーエムシー出版, 東京, 2003.
- 57) M. Eguchi, T. Ooya and N. Yui, Controlling the Mechanism of Trypsin Inhibition by the Numbers of α -Cyclodextrins and Carboxyl Groups in Carboxyethylester-Polyrotaxanes, *J. Control. Release*, **96**, 301-307 (2004).
- 58) A. Becheri, P. L. Nostro, B. W. Ninham and P. Baglioni, The Curious World of

- Polypseudorotaxanes: Cyclodextrins as Probes of Water Structure, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 3979-3987 (2003).
- 59) J. Lua, I. D. Shinb, S. Nojima^c and A. E. Tonelli, Formation and Characterization of the Inclusion Compounds between Poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) Triblock Copolymer and α - and γ -Cyclodextrin, *Polymer*, **41**, 5871-5883 (2001).
- 60) L. Huang, E. Allen and A. E. Tonelli, Study of the Inclusion Compounds Formed between α -Cyclodextrin and High Molecular Weight Poly(ethylene oxide) and Poly(ϵ -caprolactone), *Polymer*, **39**, 4857-4865 (1998).
- 61) 原田一明, シクロデキストリン超分子の構造化学, アイピーシー, 東京, 2000.
- 62) L. Huang, E. Allen and A. E. Tonelli, Study of the Inclusion Compounds Formed between α -Cyclodextrin and High Molecular Weight Poly(ethylene oxide) and Poly(ϵ -caprolactone), *Polymer*, **39**, 4857-4865 (1998).
- 63) K. Takeo and T. Kuge, Complexes of Starchy Materials with Organic Compound Part III. X-Ray Studies on Amylose and Cyclodextrin Complexes, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1174-1180 (1969).
- 64) K. Takeo and T. Kuge, Complexes of Starchy Materials with Organic Compound Part IV. X-Ray Diffraction of γ -Cyclodextrin Complexes, *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 568-574 (1970).
- 65) I. N. Topchieva, A. E. Tonelli, I. G. Panova, E. V. Matuchina, F. A. Kalashnikov, V. I. Gerasimov, C. C. Rusa, M. Rusa and M. A. Hunt, Two-Phase Channel Structures Based on α -Cyclodextrin-Polyethylene Glycol Inclusion Complexes, *Langmuir*, **20**, 9036-9043 (2004).
- 66) T. Toropainen, T. Heikkilä, J. Leppänen, L. Matilainen, S. Velaga, P. Jarho, J. Carlfors, V. P. Lehto, T. Jarvinen and K. Jarvinen, Crystal Structure Changes of γ -Cyclodextrin

- after the SEDS Process in Supercritical Carbon Dioxide Affect the Dissolution Rate of Complexed Budesonide, *Pharm. Res.*, **24**, 1058-1066 (2007).
- 67) H. S. Choi, T. Ooya, S. C. Lee, S. Sasaki, M. Kurisawa, H. Uyama and N. Yui, pH Dependence of Polypseudorotaxane Formation between Cationic Linear Polyethylenimine and Cyclodextrins, *Macromolecules*, **37**, 6705-6710 (2004).
- 68) S. C. Chan, S. W. Kuo, H. S. She, H. M. Lin, H. F. Lee and F. C. Chang, Supramolecular Aggregations through the Inclusion Complexation of Cyclodextrins and Polymers with Bulky End Groups, *J. Polymer. Sci. Polymer Chem.*, **45**, 125-135 (2007).
- 69) インスリンの Pharmacokinetics (1), ノボ・ニュース, **7**, 1986.
- 70) S. Kang, J. Brange, A. Burch, A. Volund and D. R. Owens, Subcutaneous Insulin Absorption Explained by Insulin's Physicochemical Properties. Evidence from Absorption Studies of Soluble Human Insulin and Insulin Analogues in Humans, *Diabetes Care*, **14**, 942-948 (1991).
- 71) 石井 均, インスリン グラルギン, *日病薬誌*, **40**, 1193-1198 (2004).
- 72) 松田文子, 葛谷 健, インスリン製剤, *日本臨床*, **57**, 709-717 (1999).
- 73) 清水弘明, インスリン療法とその管理の基本; 処方計画の基本, *薬局*, **59**, 351-357, (2008).
- 74) 今堀和友, 山川民夫, *生化学辞典*, 東京化学同人, 東京, 1990.
- 75) 三宅浩之, *医療用日本医薬品集*, 日本医療情報センター, 東京, 2000.
- 76) R. B. Greenwald, H. Zhao, K. Yang, P. Reddy and A. Martinez, A New Aliphatic Amino Prodrug System for the Delivery of Small Molecules and Proteins Utilizing Novel PEG Derivatives, *J. Med. Chem.*, **47**, 726-734 (2004).

- 77) K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg and H. D. Maynard, In situ Preparation of Protein - "Smart" Polymer Conjugates with Retention of Bioactivity, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 16955-16960 (2005).
- 78) N. Yamasaki, A. Matsuo and H. Isobe, Novel Polyethylene Glycol Derivatives for Modification of Proteins, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2125-2127 (1988).
- 79) M. J. Roberts and J. M. Harris, Attachment of Degradable Poly(ethylene glycol) to Proteins has the Potential to Increase Therapeutic Efficacy, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1440-1445 (1998).
- 80) Y. Nodake and N. Yamasaki, Some Properties of a Macromolecular Conjugate of Lysozyme Prepared by Modification with a Monomethoxypolyethylene glycol Derivative, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 767-774 (2000).
- 81) P. Asuri, S. S. Bale, R. C. Pangule, D. A. Shah, R. S. Kane and J. S. Dordick, Structure, Function and Stability of Enzymes Covalently Attached to Single-Walled Carbon Nanotubes, *Langmuir*, **23**, 12318-12321 (2007).
- 82) I. Kumagai, F. Sunada, S. Takeda and K. Miura, Redesign of the Substrate-binding Site of Hen Egg White Lysozyme Based on the Molecular Evolution of C-type Lysozymes, *J. Biol. Chem.*, **267**, 4608-4612 (1992).
- 83) F. M. Veronese, Peptide and Protein PEGylation: A Review of Problems and Solutions, *Biomaterials*, **22**, 405-417 (2001).
- 84) T. Ooya and N. Yui, Synthesis of Theophylline-Polyrotaxane Conjugates and Their Drug Release via Supramolecular Dissociation, *J. Control. Release*, **58**, 251-269 (1999).