

# タンパク質カプセルを用いた難水溶性 抗癌剤に対する新規DDSの開発

大阪府立大学  
大学院生命環境科学研究科  
応用生命科学専攻 教授  
乾 隆

3 すべての人に  
健康と福祉を



令和2年11月10日

# 創薬における難水溶性薬剤の問題点

- 1) ゲノム創薬研究により発見された医薬候補化合物は総じて難水溶性である。
- 2) 可溶化剤として添加される界面活性剤やpH調整剤は副作用の原因となりやすい。
- 3) 化学修飾により溶解度を上げることは可能であるが薬剤活性(薬効)を減じてしまう。



創薬研究開発から除外される  
(近年, 新薬上市が少ない原因の1つ)

## 本研究の狙い(新技術の特徴)

生体適合性キャリアであるヒト由来タンパク質を用いて、高い薬剤活性を有した難水溶性薬剤を可溶化し、且つ安全に標的がん細胞に届ける

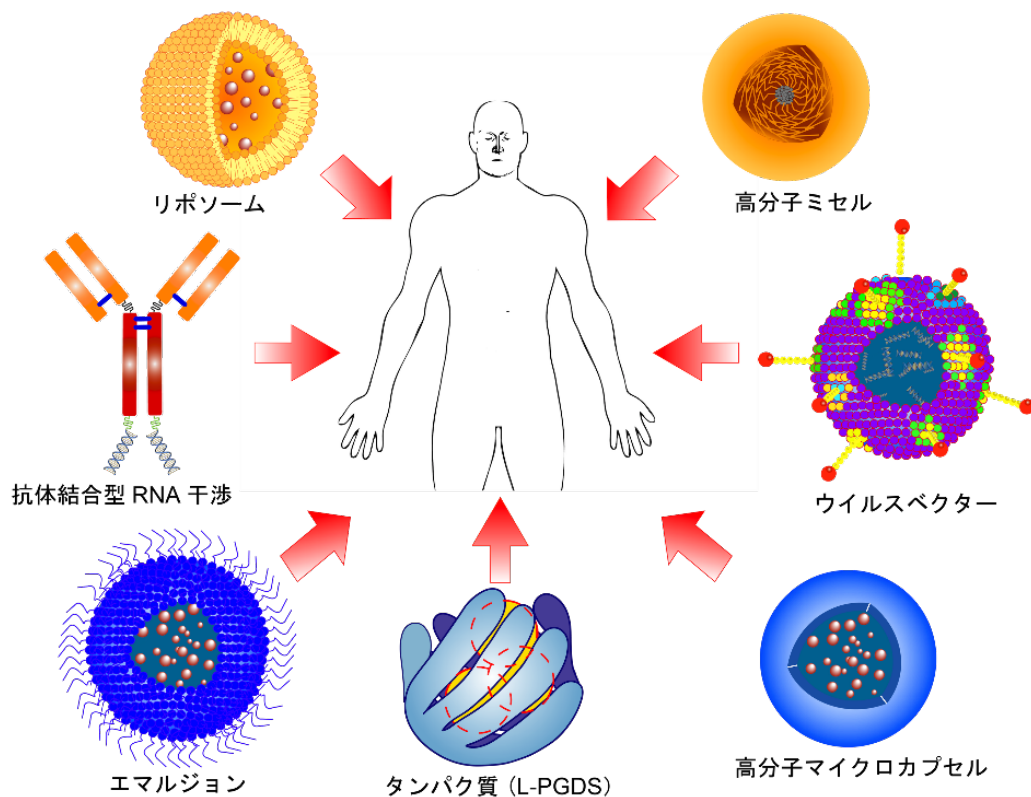


開発途中でドロップアウトした、あるいは現在開発中の難水溶性薬剤を再開発し、臨床応用へ導く

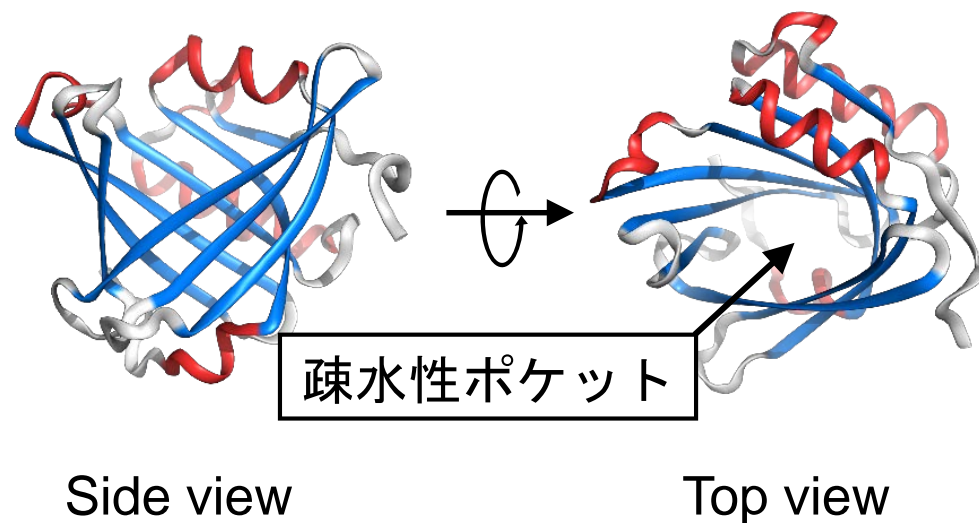
# 新技術の特徴・従来技術との比較

## 生体内輸送タンパク質 (L-PGDS; リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素)

従来のドラッグデリバリーシステム  
(DDS)



ヒト L-PGDSの構造



疎水性ポケットに  
難水溶性薬剤を内包する

# 新技術の特徴・従来技術との比較

## <L-PGDSを薬剤キャリアとして選んだ理由>

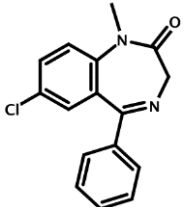
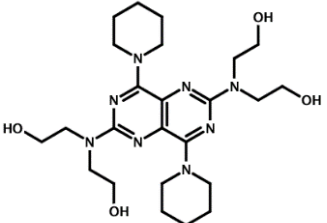
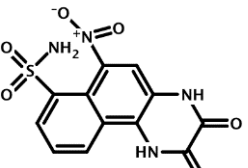
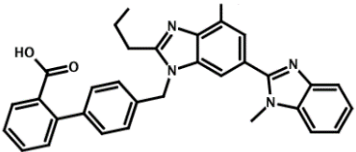
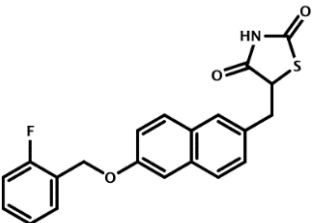
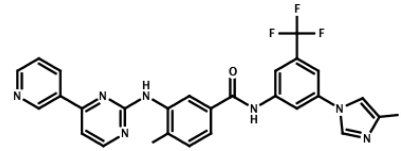
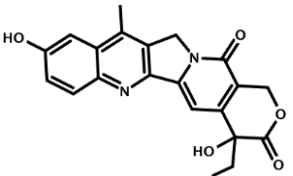
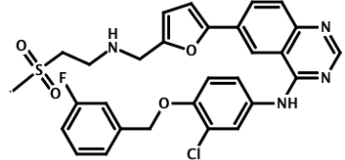
- 疎水性ポケットに難水溶性薬剤を内包することにより、**生理的条件下(pH 7.4)で薬剤の可溶化が可能**である
- ヒト型タンパク質を用いるので**生体適合性があり安全**(免疫原性がない)である
- 大腸菌発現系により大量調製ができることから、既存のDDSに比べて**低コストでの供給が可能**である
- タンパク質のN末端、あるいはC末端に腫瘍標的ペプチドを付加することにより、薬剤の**腫瘍細胞集積性の向上が可能**である
- カプセルの多量体化により、EPR効果(Enhanced permeability and retention)を利用した薬剤の**腫瘍組織集積性と滞留性の向上が可能**である



- ★ 薬剤の**静脈内投与**により、**疾患部への直接輸送**が可能である
- ★ 薬剤の**経口投与**により、**バイオアベイラビリティの向上**が期待できる

# 研究の概要(1)

生体内輸送タンパク質(L-PGDS)は、様々な  
難水溶性薬剤を可溶化できる

薬剤名	治療対象	化学構造	薬剤名	治療対象	化学構造
Diazepam ( $M_r$ : 284.7)	抑うつ 不安症状		Dipyridamole ( $M_r$ : 504.6)	狭心症 心筋梗塞	
NBQX ( $M_r$ : 336.3)	脳梗塞		Telmisartan ( $M_r$ : 514.6)	高血圧症	
MCC-555 ( $M_r$ : 381.4)	糖尿病		Nilotinib ( $M_r$ : 529.5)	白血病	
SN-38 ( $M_r$ : 392.4)	大腸癌 胃癌		Lapatinib ( $M_r$ : 581.1)	乳癌	

## 研究の概要(2)

### 1 mM L-PGDS 存在下における各薬剤の溶解度 (μM)

	PBS <sup>1)</sup>	L-PGDS (19 mg/mL, 1 mM)	HP-β-CD (19 mg/mL, 13 mM)
Diazepam	218	1739	-
NBQX	861	3113	-
MCC-555	N.D. <sup>2)</sup>	784	1050
SN-38	6.3	126	19.1
Dipyridamole	14.4	764	-
Telmisartan	9.0	1230	66.6
Nilotinib	ND <sup>2)</sup>	53.2	ND <sup>2)</sup>
Lapatinib	ND <sup>2)</sup>	234	5.4

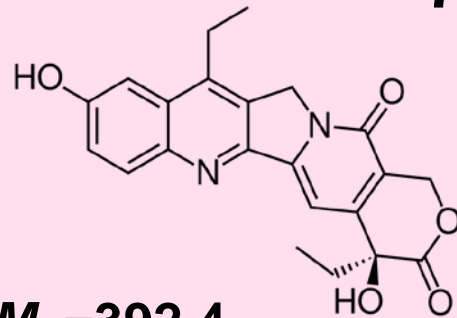
1) PBSの可溶化できる量を1とした時のL-PGDSの可溶化できる量の倍率, 2) 検出限界以下

(HP-β-CD: 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin)

# 研究の概要(3)

## 癌を標的としたDDSへの応用

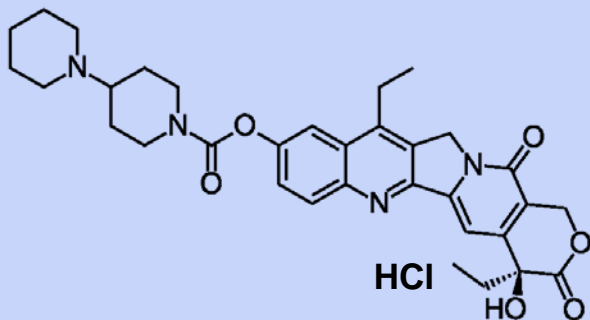
### 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38)



$M_r = 392.4$

- DNAトポイソメラーゼ I 阻害剤  
(2本鎖DNAの片側だけを切断)
- 難水溶性のため臨床応用が困難

### イリノテカン塩酸塩 (CPT-11)



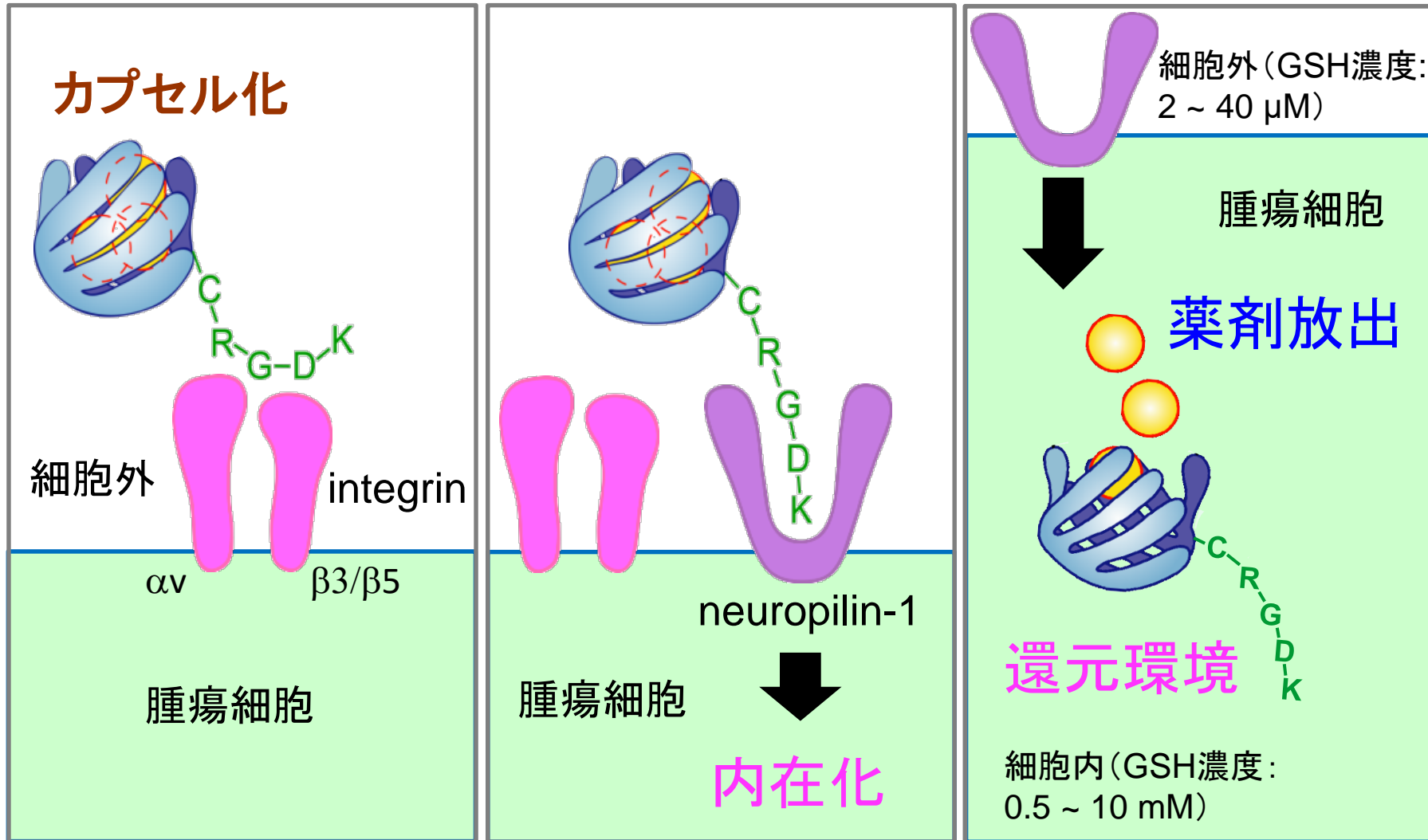
$M_r = 677.2$  (塩酸塩)

- SN-38の**プロドラッグ**
- 肺癌, **大腸癌**, 卵巣癌に使用
- SN-38への**転換効率は約10%**  
(Carboxylesterase)
- 抗腫瘍効果はSN-38の**1%以下**
- 副作用として, **激しい下痢**



# 研究の概要(4)

## 腫瘍細胞ターゲティング DDS



integrin  $\alpha_v\beta_3$  &  $\alpha_v\beta_5$  : 血管新生に関与

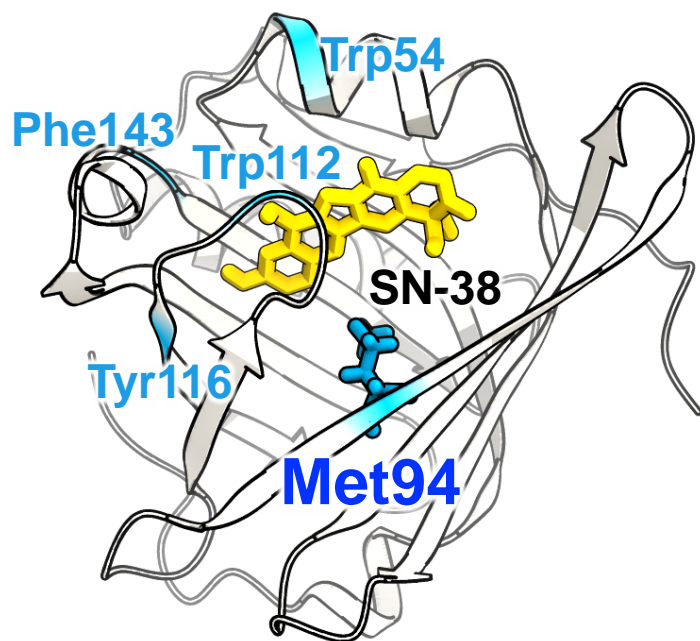
neuropilin-1 : 腫瘍の血管新生や浸潤に関与

(Sugahara, et al. **Cancer Cell**, 2009)

# 研究の概要(5)

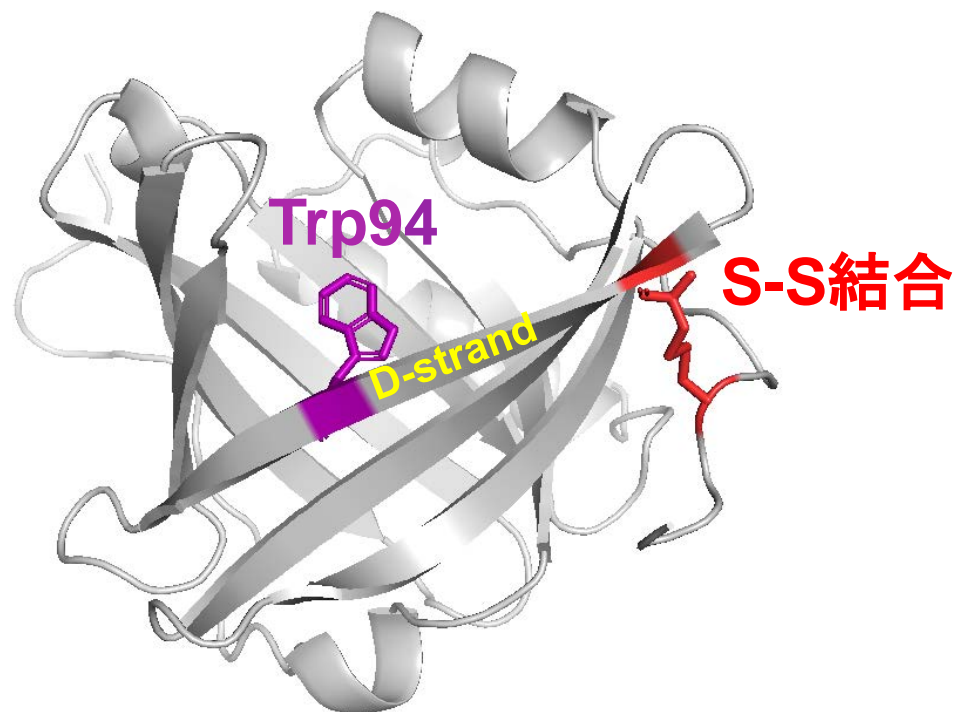
## SN-38の漏出を抑制するタンパク質カプセルの作製

L-PGDS



In silico解析により  
SN-38との結合に関わる残基を予測

M94W-L-PGDS



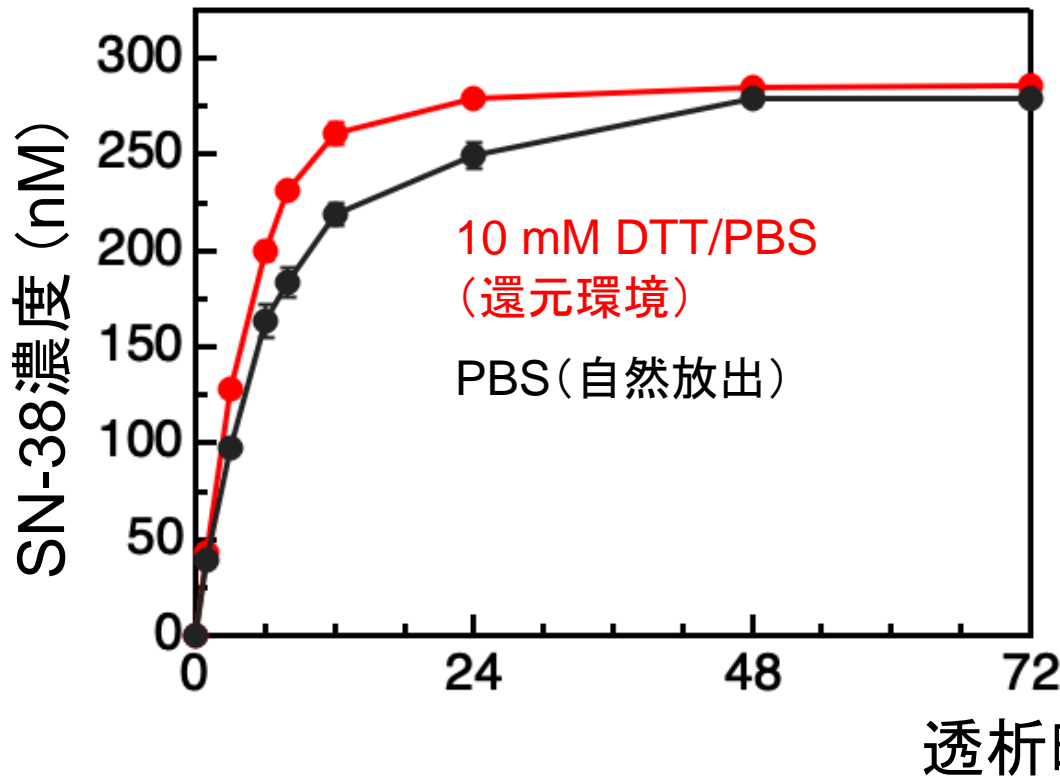
MODELLER 9.21により作製

D-strand上のMet94をTrpに置換

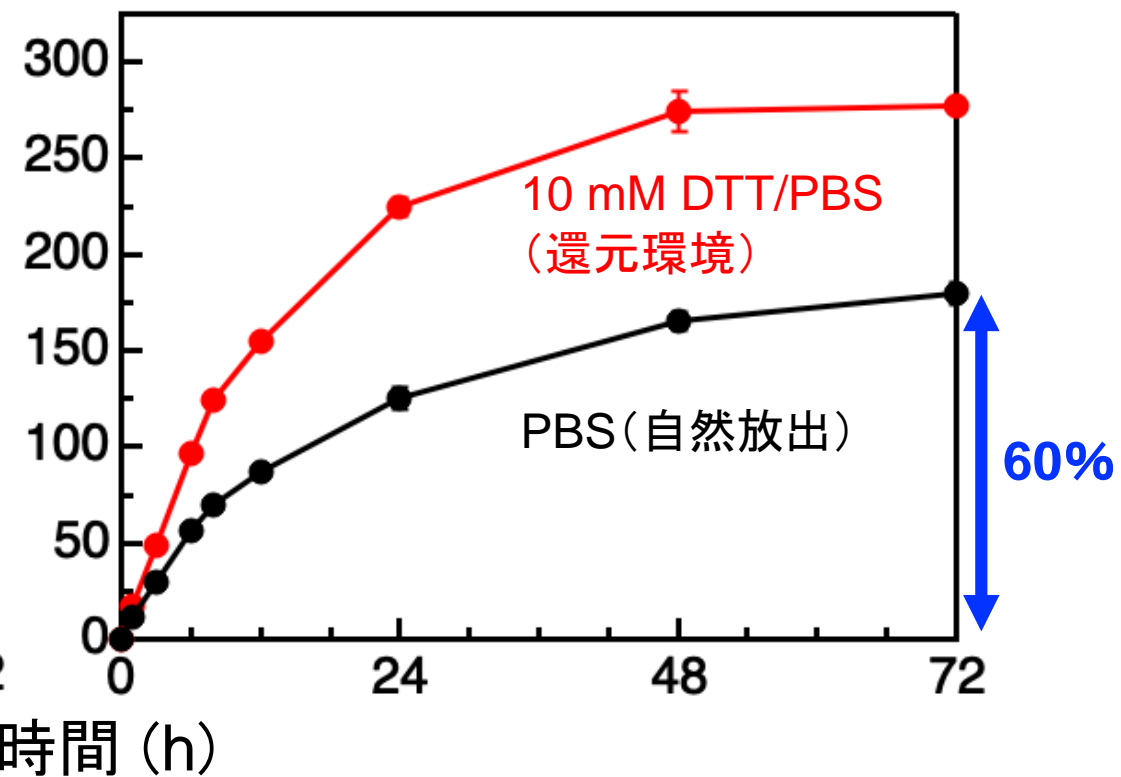
# 研究の概要(6)

## SN-38を内包カプセルからの薬剤放出実験

### L-PGDS



### M94W-L-PGDS

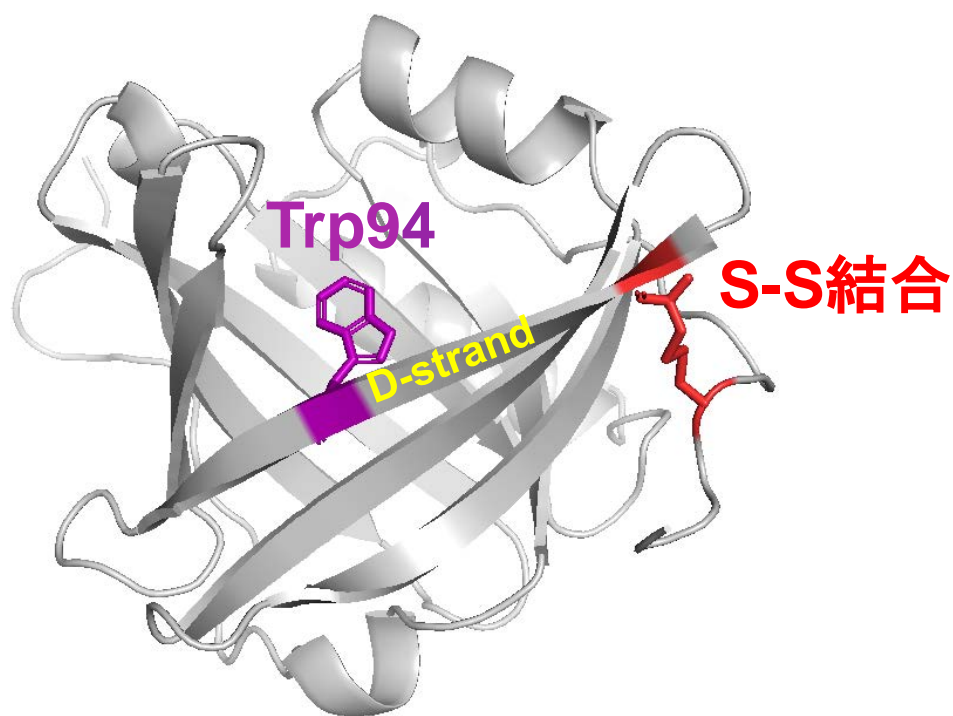


**M94W-L-PGDS**は、SN-38の自然放出を60%程度に抑制し、且つ還元環境下でSN-38の放出を促進した

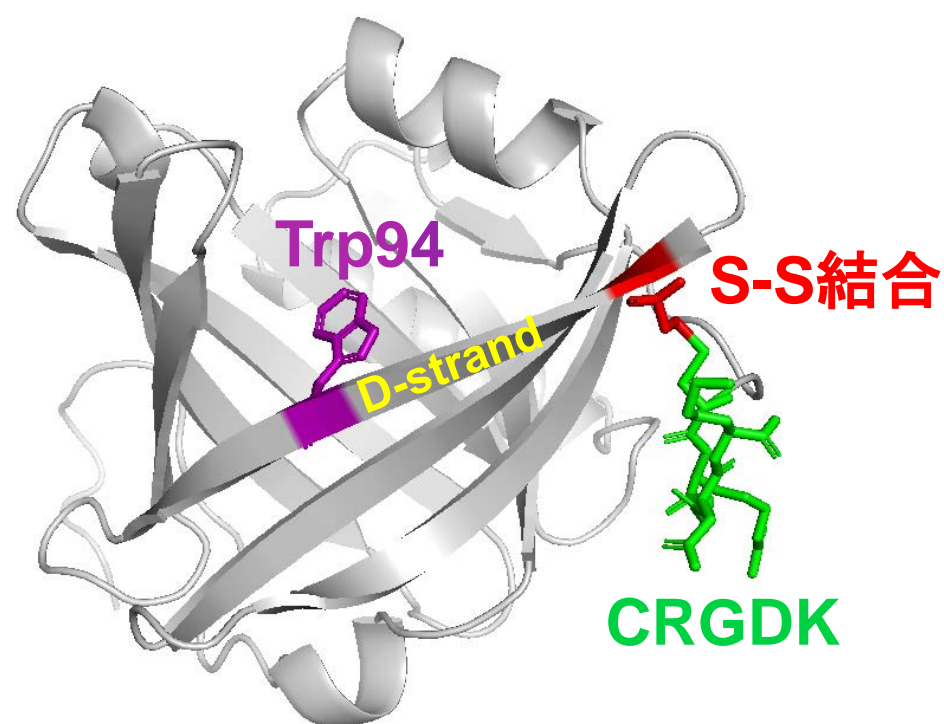
# 研究の概要(7)

## 腫瘍標的ペプチド(CRGDK)の付加

M94W-L-PGDS



M94W-L-PGDS-CRGDK

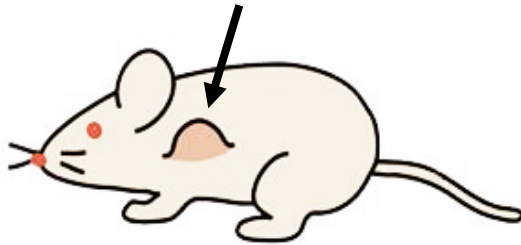


(CRGDKは、癌細胞上のneuropilin-1受容体を標的とする)

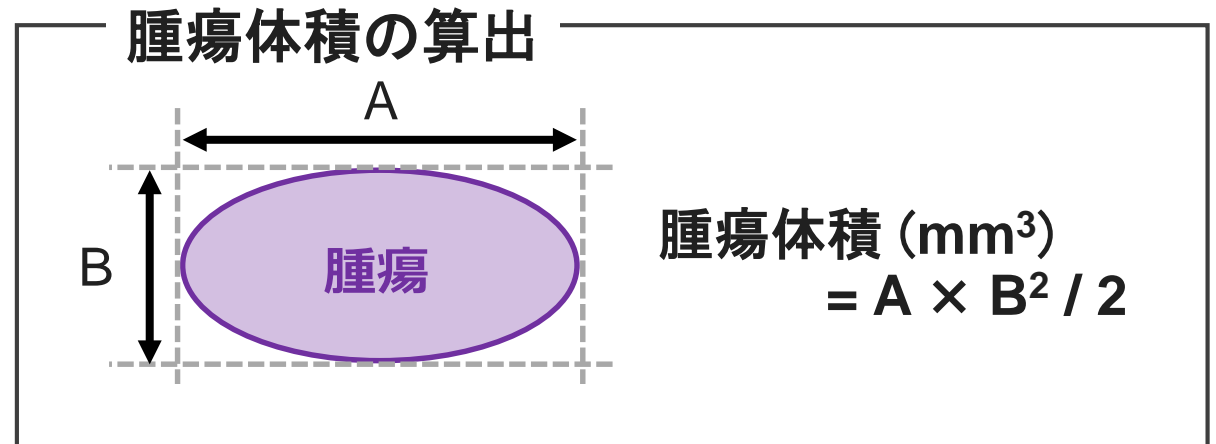
# 研究の概要(8)

## 癌疾患モデルマウスを用いた抗腫瘍実験

ヒト前立腺癌細胞PC-3



5週齢雄性 BALB/c-nu/nu マウス



腫瘍体積が250 mm<sup>3</sup>に達した日から、4日に一度で計4回、  
各サンプルを静脈内投与



PBS



SN-38/L-PGDS



SN-38/M94W-L-PGDS



SN-38/M94W-L-PGDS-CRGDK

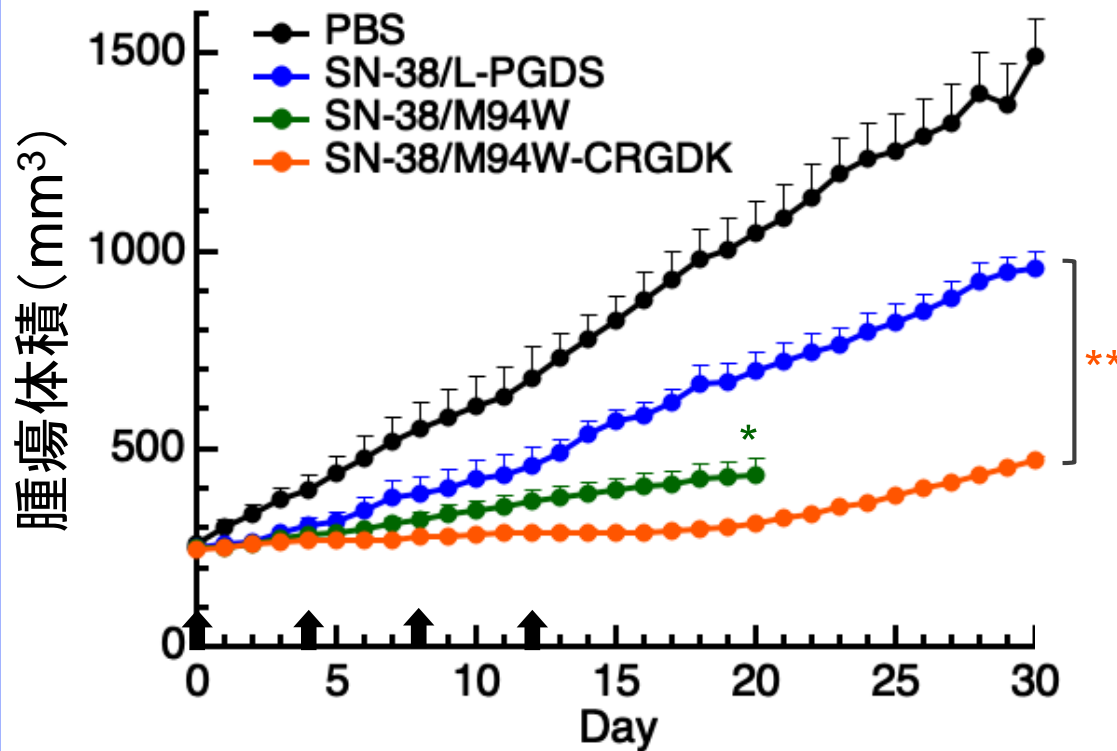
2 mg SN-38/kg/d

投与開始日から30日間、腫瘍体積、および体重を計測

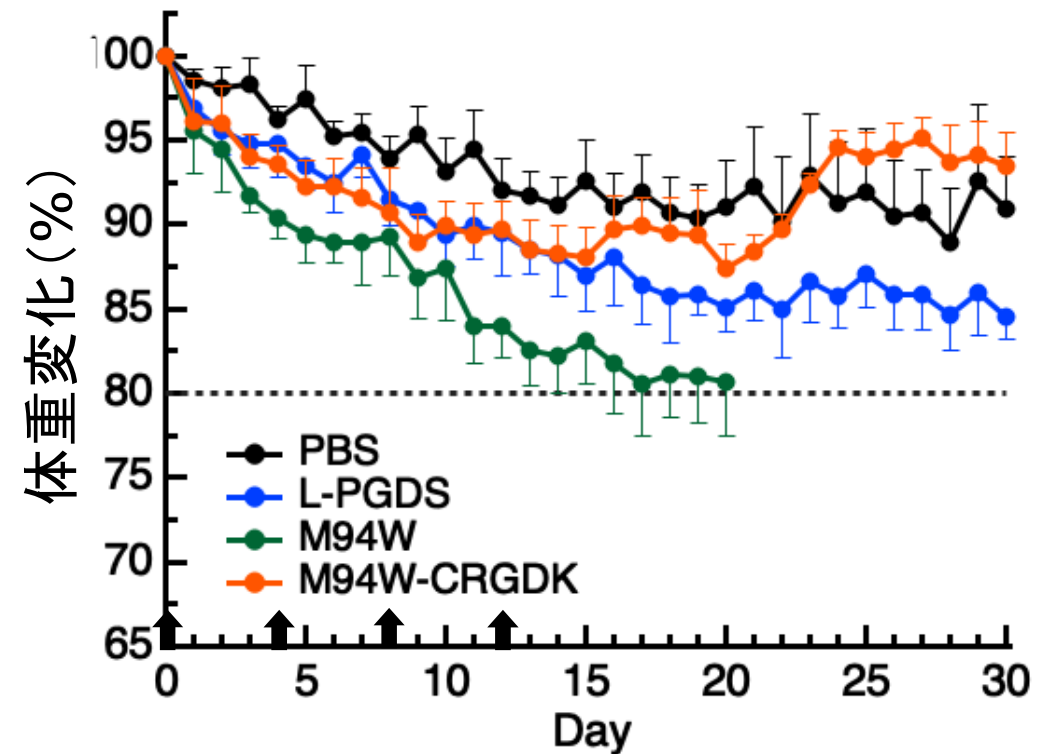
# 研究の概要(9)

## 癌疾患モデルマウスを用いた抗腫瘍実験

### 腫瘍体積変化



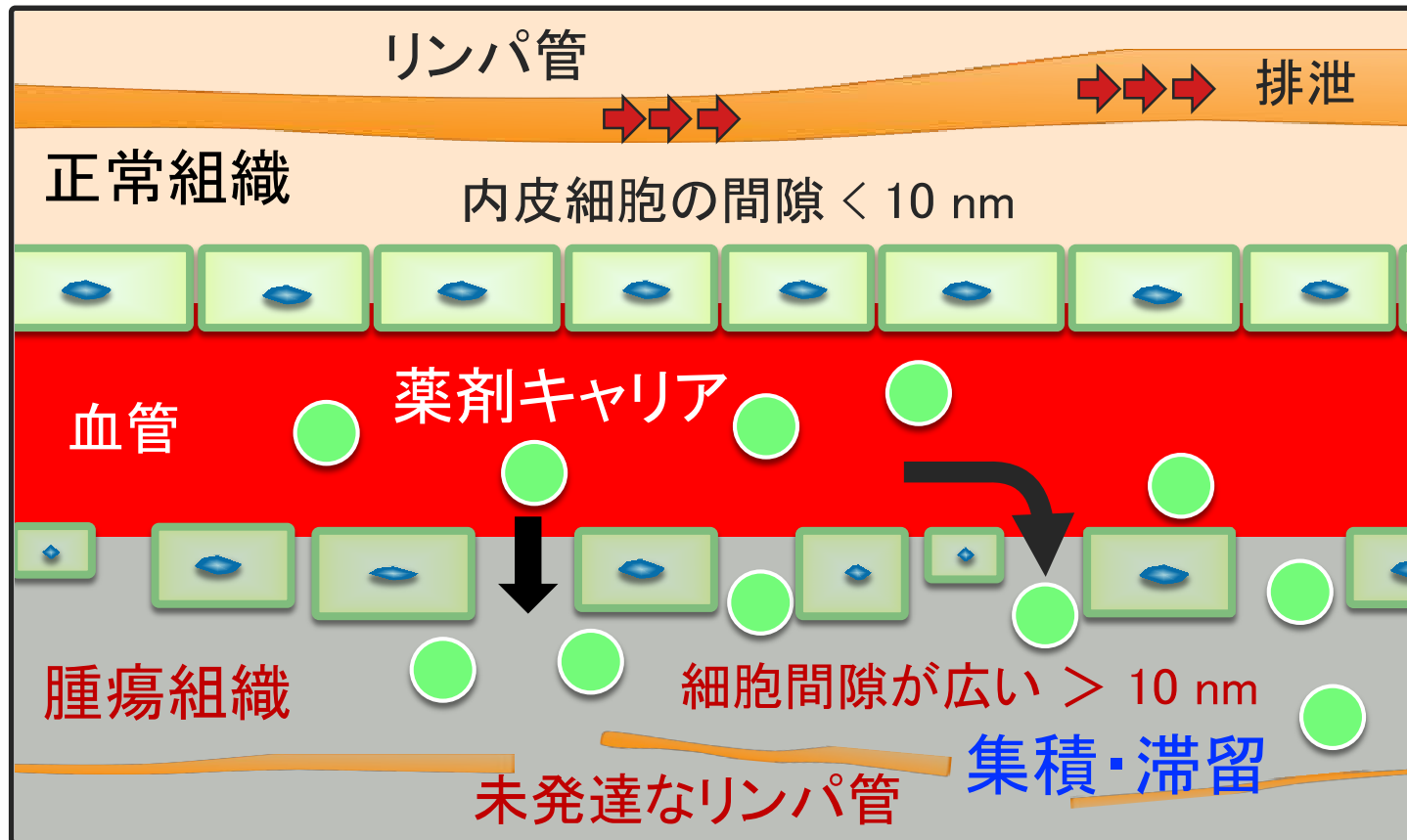
### 体重変化



The mean  $\pm$  S.E. (n=5), \*P<0.01 vs SN-38/L-PGDS, \*\*P<0.001 vs SN-38/L-PGDS (one-way ANOVA and Turkey Kramer HSD test)

# 研究の概要(10)

## EPR効果を利用した薬剤腫瘍集積性・滞留性の向上



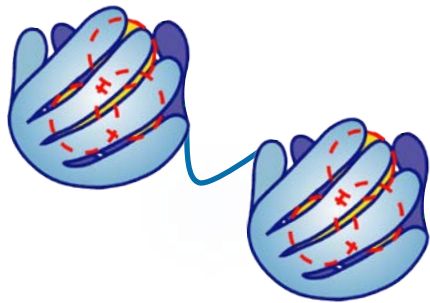
### EPR効果 (Enhanced permeability and retention 効果)

腫瘍組織では、血管内皮細胞間に200 nm程度の間隙が存在し、**>10 nmの薬剤**は血管壁を抜けて組織中へ透過し、**病変部位の薬剤濃度が上昇**する。一方、未発達なリンパ管は、組織中の異物を排除できず、取り込まれた薬剤は腫瘍組織中に**長時間滞留・残存**する。

# 研究の概要(11)

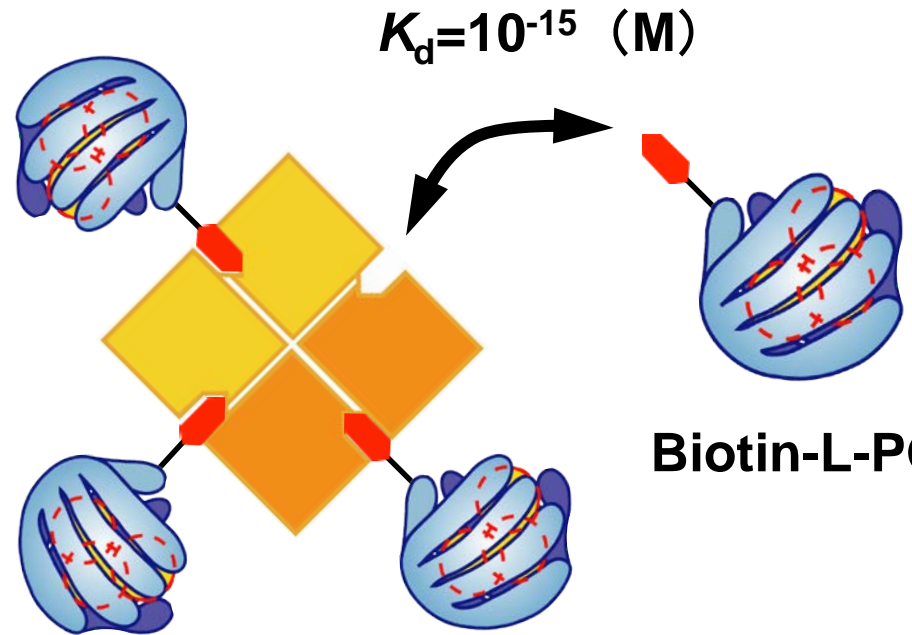
## ストレプトアビジン-ビオチンシステムを利用した L-PGDSの多量体化

2量体



Linker  
GGGGS

4量体



Biotin-L-PGDS

SA-[Biotin-L-PGDS]<sub>4</sub>  
(Tetramer L-PGDS)


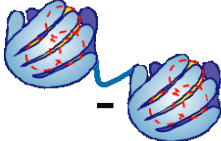
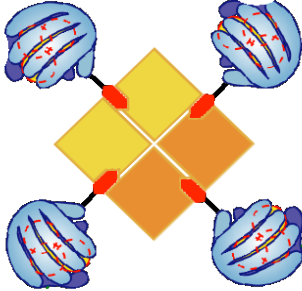
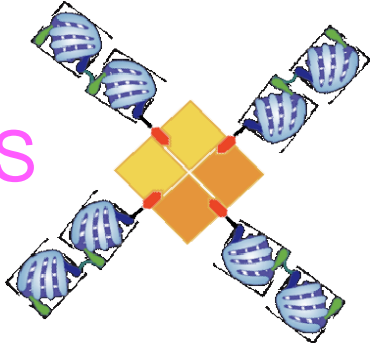
Streptavidin  
(SA)  
 $Mr=53,000$

Biotin  
 $Mr=244.31$



# 研究の概要(12)

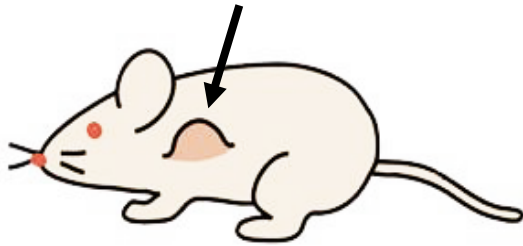
## SN-38の溶解度とキャリアの最大長

タンパク質キャリア		SN-38濃度 (μM)	$D_{max}$ (nm)
2 mM 単量体 L-PGDS		1,700	4.8
1 mM 2量体 L-PGDS		1,750	9.2
0.5 mM 4量体 L-PGDS		1,420	14
0.25 mM 8量体 L-PGDS		1,500	22

# 研究の概要(13)

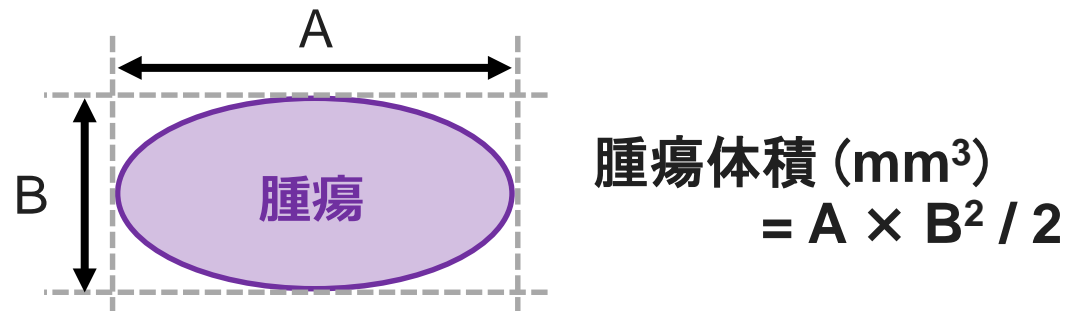
## 癌疾患モデルマウスを用いた抗腫瘍実験

ヒト前立腺癌細胞PC-3



5週齢雄性 BALB/c-nu/nu マウス

腫瘍体積の算出



腫瘍体積が250 mm<sup>3</sup>に達した日から, 4日に一度で計4回,  
各サンプルを静脈内投与



PBS



SN-38/単量体 L-PGDS



SN-38/ 4量体 L-PGDS



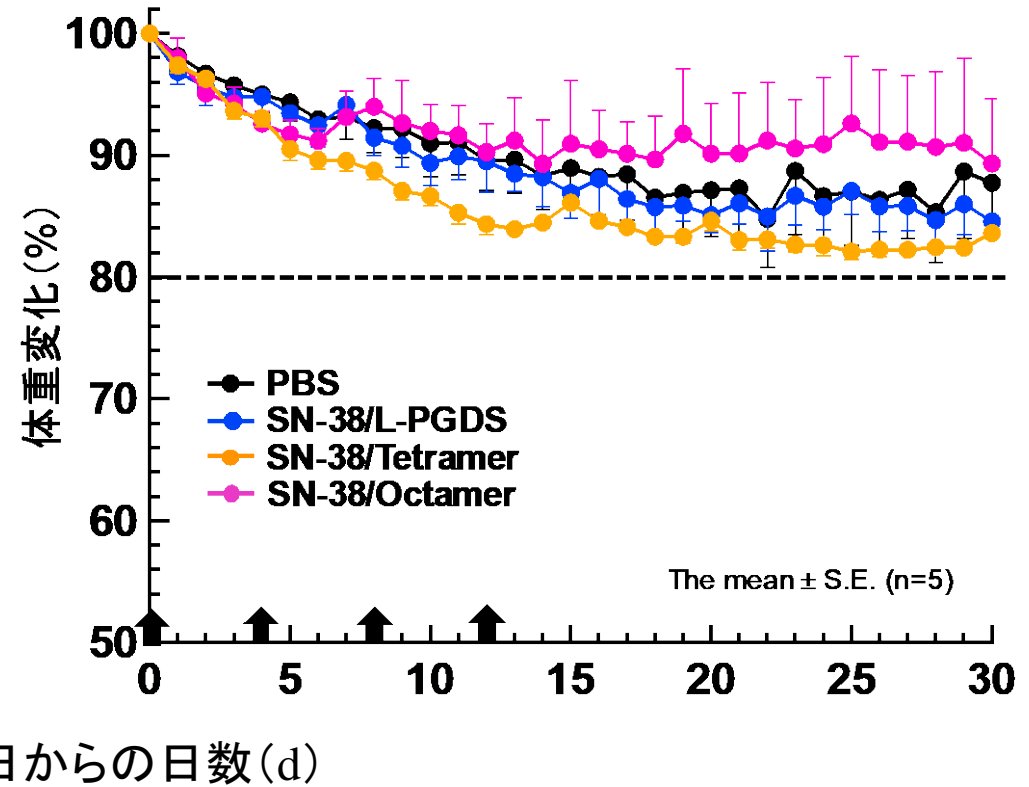
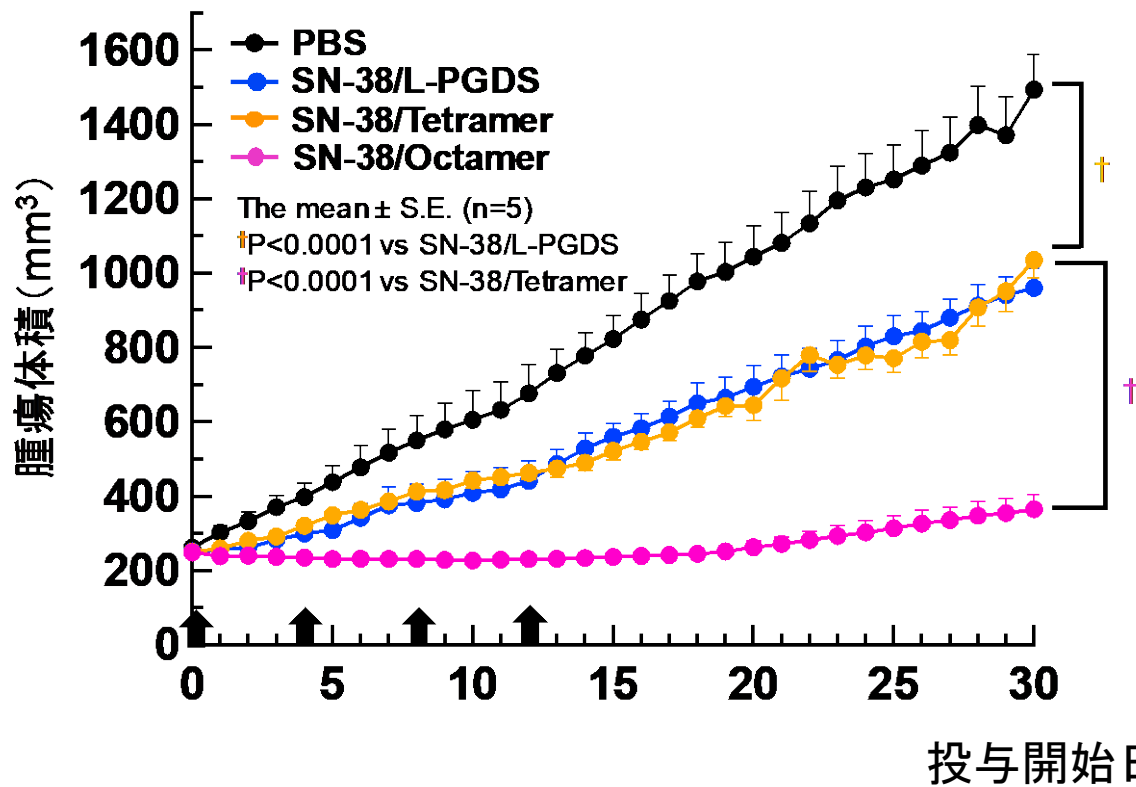
SN-38/ 8量体 L-PGDS

2 mg SN-38/kg/d

投与開始日から30日間, 腫瘍体積, および体重を計測

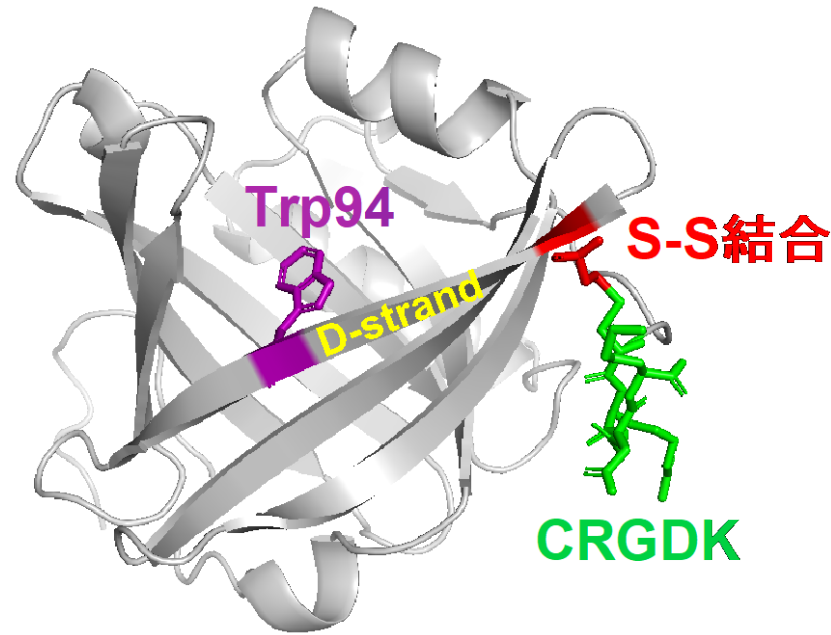
# 研究の概要(14)

## SN-38内包多量体L-PGDSの*in vivo* 抗腫瘍効果

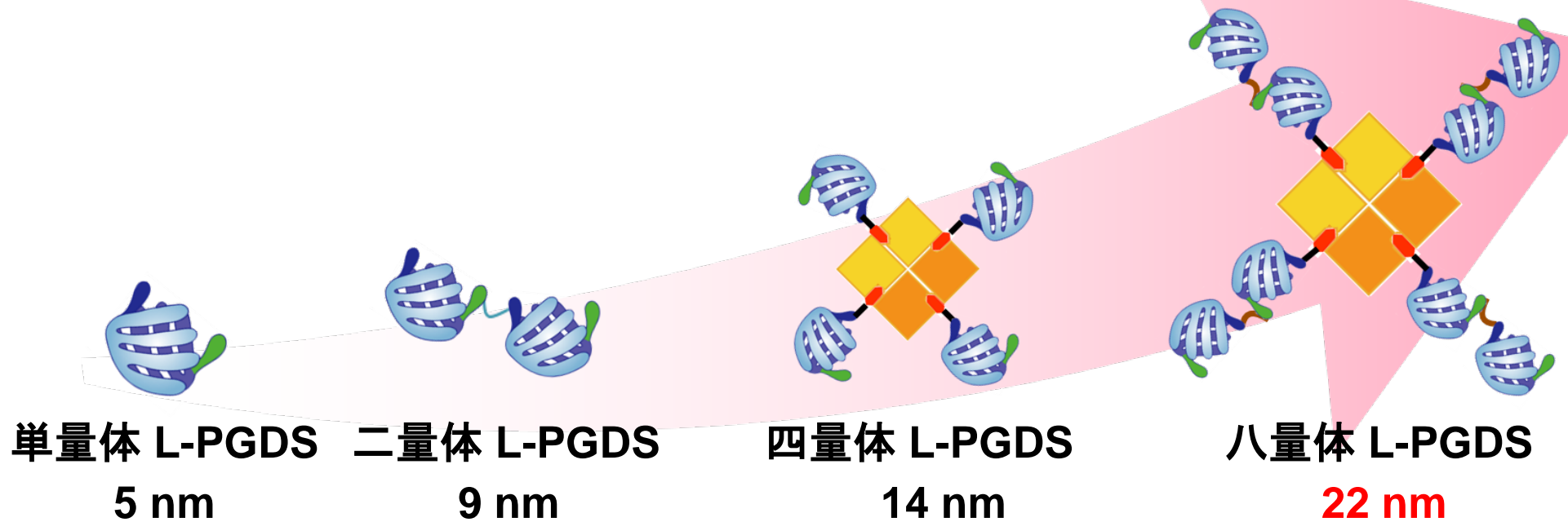


(one-way ANOVA and Turkey Kramer HSD test)

# がん細胞標的ペプチドを付加したカプセル



## がん組織への集積性と滞留性を目指した多量体化



## 想定される用途

- 本DDS技術の適応により、**難治性がん**に対する静脈内投与での有効性を高め、従来の**化学療法**を大きく凌駕することが期待できる。
- 本キャリアタンパク質は**ペプシン耐性**であり、胃内では分解されず、腸内で分解されることから、**難水溶性薬剤の腸溶剤**としての利用も考えられる。

## 実用化に向けた課題

- 現在, in vivoにおいて, **SN-38内包カプセル**や**多量体キャリア**が, 前立腺がんや大腸がんに対して効果的であることは検証済みである。
- 今後, 最先端の遺伝子工学を駆使して, 血中での**薬剤漏出を抑えたカプセル**の作製を行う。
- SN-38を内包した**本DDSをプロトタイプ**として, **難治性がんへの臨床応用**を目指して, in vivo 実験データを蓄積する。

## 企業への期待

- 今回紹介した抗がん剤SN-38のように、優れた薬効を有するが、難水溶性のために開発から脱落した薬剤や、現在開発中であるが難水溶性のために苦勞している**薬剤を提供できる製薬企業との共同研究**を希望します。
- 本DDS技術により**薬剤溶解度の問題を必ず克服**し、製薬企業の持つ薬剤の**価値を大きく高める**ことができると思っています。

# 本技術に関する知的財産権

(1) 発明の名称: 化合物の溶解補助剤とそれを含む組成物

出願番号: 特許第5099545号

出願人: 公立大学法人大阪

発明者: 乾 隆 他

(2) 発明の名称: カプセルタンパク質とその多量体組成物  
およびそれを用いた医薬組成物

出願番号: PCT/JP2020/019827

出願人: 公立大学法人大阪

発明者: 乾 隆



# 産学連携の経歴

2007年	JST A-step事業に採択
2011年-2012年	A化学系会社と共同研究実施
2013年-2015年	B製薬会社と共同研究実施
2019年-2020年	C製薬会社と共同研究実施
2019年-2020年	D製薬会社と共同研究実施

# お問い合わせ先

公立大学法人大阪 大阪府立大学  
研究推進本部 URAセンター

TEL:072-254-9128

FAX:072-254-7475

e-mail : [URA-center@ao.osakafu-u.ac.jp](mailto:URA-center@ao.osakafu-u.ac.jp)