高分子薬物の体内動態特性の解析と動態制御法の開発

高倉 喜信

Pharmacokinetic Analysis and Development of Delivery Systems of Macromolecular Drugs

Yoshinobu TAKAKURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto

Summary: Various endogenous macromolecular substances have become a new class of therapeutic agents with recent progress in biotechnology. For a successful use of the macromolecular drugs, optimal delivery systems should be developed. In our laboratory, a series of pharmacokinetic studies have been carried out aiming at the development of delivery systems for macromolecular drugs. As the first step towards the development of delivery systems, we studied pharmacokinetic characteristics of macromolecules in relation to their physicochemical properties such as molecular weight and electric charge. Based on the findings, we first developed macromolecular prodrugs of an antitumor antibiotic, mitomycin C (MMC). MMC was covalently conjugated with dextran and various types of macromolecular prodrug of MMC were developed for tumor targeting. Similar strategy was applied to the development of delivery systems for various protein drugs. For example, successful targeting of recombinant superoxide dismutase (SOD) to the liver, kidney and blood circulation was achieved by chemical modification of the protein drug. Very recently, we have been trying to develop delivery systems for nucleic acid drugs such as antisense oligonucleotides and plasmid DNA. Based on the same concept, delivery systems have been tested to control the in vivo behavior of the nucleic acid drugs. The strategy for rational design of delivery systems for various types of macromolecular drugs has thus been established through the pharmacokinetic studies.

Key words: Pharmacokinetic analysis, Drug delivery system, Antitumor drugs, Protein drugs, Nucleic acid drugs

1. はじめに

近年の遺伝子工学などのバイオテクノロジーの大きな進展により、本来生体内に存在する種々の生理活性タンパク質をはじめとする生体高分子や、最近では遺伝子そのものを医薬品として応用する試みが進められている。これらの高分子薬物を用いた薬物治療を実現するためには、標的作用部位に選択的に送達することのできる体内動態制御法の開発が必要不可欠と考えられる。我々は、種々の高分子薬物を対象に取り上げ、これらの体内動態解析を薬物速度論の手法を用いて系統的に行い、得られた情報に基づき体内動態を制御することのできる方法論の確立を試みてきた。以下に我々の研究成果の概略を紹介する。

2. 高分子の一般的な体内動態特性

生体に投与された高分子物質の体内動態は、基本的にはその高分子の分子構造に由来する物理化学的性質と、生体側の解剖学的あるいは生理学的要因とのバランスにより規定されると考えられる。したがって高分子薬物の“構造—物性—動態”の関係を明らかにすれば、目的とする動態特性を示す物性を持つように、たとえば化学修飾で分子構造を修飾することで動態制御が達成できると思われる。しかしながら、高分子の体内動態に関する情報は乏しく、薬物動態学的な定量的な検討はほとんど行われていなかった。そこで我々は研究の第一段階として、種々のモデル高分子を対象に行った基礎的検討により、高分子薬物の物理化学的、生物学的特性と薬物速度論的な体内動態特性との関連を体系的に整理することを

Fig. 1 Hepatic uptake and urinary excretion clearances of model macromolecules in mice after intravenous injection: Effect of molecular weight (*upper*) and effect of electric charge (*lower*)

試みた¹⁾。Fig. 1はその結果をまとめたもので、分子量、電荷の異なるタンパク質、多糖類など各種モデル高分子の静脈内投与後の体内動態を主として規定する肝臓取り込みクリアランスと尿中排泄クリアランスの値をプロットしたものである。これより、物理化学的性質の違いにより高分子の動態特性は大きく異なることがわかる。すなわち、腎臓における糸球体濾過が基本的には分子量に依存した限外濾過現象であるため、分子量約50,000以下の高分子の消失には尿中排泄が大きく寄与すること、また強い負電荷を持つもの^{2,3)}は非実質細胞に存在するスカベンジャーレセプターを介したエンドサイトーシスの機構により、また正電荷を持つものは静電的な相互作用に基づく吸着性エンドサイトーシスにより肝臓により速やかに取り込まれることが示されている。さらに糸球体濾過速度、肝血漿流速、肝臓のfluid-phase endocytosisの速度などの生理学的パラメータとこれらの値の関係も明らかになった。以上の結果に基づき、以下の述べるような種々の高分子薬物の動態制御法の確立を試みた。

3. 抗癌剤の高分子化プロドラッグの開発

腫瘍組織においては、一般に毛細血管の透過性が亢進している一方で、リンパ系が未発達であるため高分子が蓄積しやすいことが知られている。適当な高分子化プロ

ドラッグを設計すれば、この現象をうまく利用して抗癌剤の腫瘍ターゲティングが実現できると考えられる⁴⁾。

担癌マウスを用いて体内動態を解析した結果、高分子の分子量、電荷など物理化学的性質が異なっても腫瘍取り込みクリアランスには大きな違いはないことが示され、安定に血液中を循環する高分子プロドラッグを設計すれば、腫瘍への受動ターゲティングが達成されることが考えられた。そこで我々は抗癌性抗生物質マイトマイシンC (MMC) を取り上げ、これを dextran に共有結合させた高分子化プロドラッグ MMC-dextran 結合体 (MMCD) を合成した⁵⁻⁹⁾。合成に用いる dextran の分子量や spacer の種類や結合様式を選択することにより MMCD の分子量や電荷などを任意に制御することができるが、全身投与時の腫瘍ターゲティングには弱い負電荷を持ち分子量7万の MMCDan を選択した。Fig. 2に示すように MMCDan は尿中排泄および肝臓取り込みクリアランスが小さいため血中滞留性に優れていることが確認された。その結果、マウスの皮下に移植された固形腫瘍 (S180) に高い蓄積を示し、優れた腫瘍増殖抑制効果を発現することが明らかとなった。さらに、同様のアプローチはヒト大腸ガン細胞に対するモノクローナル抗体 (A7) を利用した能動的ターゲティングにも応用できることも明らかとなり (Fig. 2), ノードマウスの系で標的細胞 SW1116 細胞の増殖を有意に抑制す

Fig. 2 Hepatic uptake and urinary excretion clearances of mitomycin C (MMC) dextran conjugate with anionic charges (MMC-Dan) and cationic charges (MMC-Dcat) and its conjugate with monoclonal antibody (A7) in mice bearing Sarcoma 180 (S-180) and human colon cancer (SW1116)

ることが示された¹⁰⁾。以上のように、標的組織に対する親和性のみならず全身レベルでのファーマコキネティクスを考慮した動態制御の重要性が示された。

4. タンパク質医薬品の細胞特異的ターゲティング

遺伝子組み換え技術により産生されるサイトカインなど種々の生理活性タンパクが既に実用化されている。しかしながら、これらは様々な問題点を抱えており、とりわけ生体内安定性や標的細胞への到達性など体内動態に関する問題は重要課題であり、これらを克服できる方法論の確立が望まれている。そこで我々は、化学修飾により種々のタンパク質医薬品を対象にその物理化学的性質を改変することによる体内挙動の制御を試みた¹¹⁻¹³⁾。ここでは superoxide dismutase (SOD) の結果について述べる。SOD (分子量約32,000) は、活性酸素の関与する種々の疾病の治療薬として期待されながら速やかに尿中排泄を受けるため使用が制限されている。そこでこうした問題を解決できる動態制御法の開発を目的に、SOD の分子サイズや静電的な性質を改変したり、さらに標的細胞による特異的認識素子として適当な糖鎖構造を導入した誘導体を設計した。その結果、Fig. 3 に示したように SOD が生体内で活性酸素消去酵素として機能し、治療効果を発現するために必要な種々の体内動態パターンを創り出せることが証明できた¹⁴⁻¹⁸⁾。す

なわち、1) PEG や負電荷を有する CM-dextran で高分子化することにより血中滞留性を数十倍から数百倍改善できる。2) galactose (Gal-SOD) および mannose (Man-SOD) 分子を導入することにより、各糖鎖を認識する肝臓の実質細胞および非実質細胞(血管内皮細胞、Kupffer 細胞)の細胞内に receptor-mediated endocytosis の機構により千倍以上の速度でターゲティングできる。3) 正電荷を有する DEAE-dextran 修飾により肝臓の細胞表面に局在化できる。4) 負電荷を導入する (Suc-SOD) ことによりポリアニオンを特異的に認識する scavenger receptor を介して肝非実質細胞に送達できる。5) 正電荷を導入する (Cat-SOD) ことで腎臓への選択的移行が得られることが示された。なかでも肝虚血再灌流障害に対して優れた治療効果を示した Gal-SOD および Man-SOD は¹⁴⁾、臓器移植や虚血性疾患における臓器障害の予防薬・治療薬としての臨床応用も期待されている。

5. 遺伝子医薬品の動態制御法の開発

さらに最近では、遺伝子発現を制御できる物質が全く新しい概念に基づく医薬品の候補物質として考えられ、種々の難治性疾患の新しい遺伝子レベルでの治療法として期待されている¹⁹⁾。本アプローチは薬物治療の観点からは全く新しい概念に基づくものであるが、ここで薬物として用いられる核酸が遺伝情報を含んだ高分子物質

Fig. 3 Control of pharmacokinetic profiles of human recombinant superoxide dismutase (SOD) by chemical modification: Effect on hepatic uptake and urinary excretion clearances

であることに着目し、既に述べた高分子化抗癌剤プロドラッグやタンパク質医薬品の動態制御法確立における成果に基づき遺伝子医薬品の体内動態制御法の開発を試みた。

我々はまず最初に核酸の体内動態に関する情報がきわめて乏しいことを踏まえ、遺伝子医薬品の基本的な体内動態を明らかにすることを試みた^{3,20)}。モデル薬物として plasmid DNA (cCAT) および各種 oligonucleotide (oligo) を用いた。その結果、これらはマウス静脈内に投与後、速やかに血中より消失するとともに、これと並行して分解を受けることが示された。分解の影響を無視できる投与後初期のデータに対して薬物速度論的解析を行った結果、oligo が糸球体濾過速度に近い速度で尿中に排泄されるとともに肝臓に高い移行性を有し、一方、pCAT はほぼ肝血流に近い速度で肝臓に効率よく除去されることが明らかとなった (Fig. 4)。さらに臓器灌流実験を行いこれらの現象を詳細に臓器レベルで検討したところ、ラット灌流肝において pCAT は肝臓の非実質細胞に優先的に取り込まれていることが明らかとなり²¹⁾、一方 oligo は実質細胞、非実質細胞の両者に非特異的に取り込まれることが示された²²⁾。また pCAT の肝非実質細胞による取り込みは、ポリアニオンの立体構造を特異的に認識する scavenger receptor を介することが明らかになった。一方 oligo に関しては、灌流腎に

おいて糸球体濾過後再吸収されるとともに血管側から直接腎組織に移行することが示された^{23,24)}。さらには血管側からの取り密みに関しては scavenger receptor を介する機構の関与が示唆された。

以上の結果より、遺伝子医薬品は遺伝情報コードする物質であっても基本的には負電荷を有する水溶性ポリアニオンとしての物理化学的性質がその体内動態を規定していることが明らかとなった。したがって遺伝子医薬品の標的組織へのデリバリーを実現するためには、こうしたポリアニオンとしての体内動態プロセスを制御することが重要と考えられる。現在までに、oligo に対しては血中滞留型の高分子キャリアーに結合させることにより、その動態特性を反映して長時間循環血液中に滞留させることができること (Fig. 4)、一方、pCAT に関しては遺伝子導入に繁用される cationic liposome と複合体を形成させることでポリアニオンとしての体内動態特性がコントロールされること、さらにはこの複合体投与による遺伝子発現と体内動態の関連も明らかにしている^{25,26)}。

6. おわりに

以上、高分子薬物の体内動態の解析を通じて種々の動態制御法を、高分子薬物の“構造—物性—動態”の相関に基づき演繹的に開発する方法を確立することができ

Fig. 4 Hepatic uptake and urinary excretion clearances of plasmid DNA (pCAT) and model oligonucleotide (3'M5'B-T₁₀) and its conjugate with carboxymethyl dextran (CMD) in mice

た²⁷⁾。本研究で確立された戦略は、今後遺伝子医薬品に象徴されるような新しいタイプの高分子薬物を利用した薬物治療を実現するための有力な方法論になるものと思われる。

謝 辞：本研究は、京都大学薬学部薬理学教室において行われたものであり、研究を遂行するにあたり終始御指導御鞭撻を賜りました京都大学名誉教授、摂南大学薬学部教授瀬崎 仁先生ならびに京都大学薬学部教授橋田 充先生に衷心より感謝申し上げます。また、研究に御協力いただいた教室員の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Takakura, Y., Fujita, T., Hashida, M. and Sezaki, H.: Disposition characteristics of macromolecules in tumor-bearing mice. *Pharm. Res.* **7**: 339-346 (1990).
- 2) Takakura, Y., Fujita, T., Furitsu, H., Nishikawa, M., Sezaki, H. and Hashida, M.: Pharmacokinetics of succinylated proteins and dextran sulfate in mice: Implications for hepatic targeting of protein drugs by direct succinylation via scavenger receptors. *Int. J. Pharm.* **105**: 19-29 (1994).
- 3) Kawabata, K., Takakura, Y. and Hashida, M.: The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: Involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm. Res.* **12**: 825-830 (1995).
- 4) Takakura, Y. and Hashida, M.: Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: Macromolecular prodrugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **18**: 207-231 (1995).
- 5) Takakura, Y., Matsumoto, S., Hashida, M. and Sezaki, H.: Enhanced lymphatic delivery of mitomycin C conjugated with dextran. *Cancer Res.* **44**: 2505-2510 (1984).
- 6) Takakura, Y., Kitajima, M., Matsumoto, S., Hashida, M. and Sezaki, H.: Development of a novel polymeric prodrug of mitomycin C, mitomycin C-dextran conjugate with anionic charge. I: Physicochemical characteristics and *in vivo* and *in vitro* antitumor activities. *Int. J. Pharm.* **37**: 135-143 (1987).
- 7) Takakura, Y., Atsumi, R., Hashida, M. and Sezaki, H.: Development of a novel polymeric prodrug of mitomycin C, mitomycin C-dextran conjugate with anionic charge. II: Disposition and pharmacokinetics following intravenous and intramuscular administration. *Int. J. Pharm.* **37**: 145-154 (1987).
- 8) Takakura, Y., Takagi, A., Hashida, M. and Sezaki, H.: Disposition and tumor localization of mitomycin C-dextran conjugates in mice. *Pharm. Res.* **4**: 293-300 (1987).
- 9) Takakura, Y., Matsumoto, S., Hashida, M. and Sezaki, H.: Physicochemical properties and antitumor activities of polymeric prodrugs of mitomycin C with different regeneration rates. *J. Controlled Release* **10**: 97-105 (1989).
- 10) Noguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: Preparation and properties of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C-dextran conjugate. *Bioconjugate Chem.* **3**: 132-137 (1992).
- 11) Takakura, Y., Kaneko, Y., Fujita, T., Hashida, M. Maeda, H. and Sezaki, H.: Control of pharmaceutical properties of soybean trypsin inhibitor by conjugation with dextran I: Synthesis and characterization. *J. Pharm. Sci.* **78**: 117-121 (1989).
- 12) Takakura, Y., Fujita, T., Hashida, M., Maeda, H. and Sezaki, H.: Control of pharmaceutical properties of soybean trypsin inhibitor by conjugation with dextran II: Biopharmaceutical and pharmacological properties. *J. Pharm. Sci.* **78**: 219-222 (1989).
- 13) Fujita, T., Yasuda, Y., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: Alteration of biopharmaceutical properties of drugs by their conjugation with water-soluble macromolecules: Uricase-dextran conjugate. *J. Controlled Release* **11**: 149-156 (1990).
- 14) Fujita, T., Furitsu, H., Nishikawa, M., Takakura, Y., Sezaki, H. and Hashida, M.: Therapeutic effects of superoxide dismutase derivatives modified with mono- and polysaccharides on hepatic injury induced by ischemia/reperfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 191-196 (1992).
- 15) Fujita, T., Nishikawa, M., Tamaki, C., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H.: Targeted delivery of human recombinant superoxide dismutase by chemical modification with mono- and polysaccharide derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**: 971-978 (1992).
- 16) Takakura, Y., Mihara, K. and Hashida, M.: Control of the disposition profiles of proteins via chemical modification. *J. Controlled Release* **28**: 111-119 (1994).
- 17) Mihara, K., Oka, Y., Sawai, K., Takakura, Y. and Hashida, M.: Improvement of therapeutic effect of human recombinant superoxide dismutase on ischemic acute renal failure in the rat via cationization and conjugation with polyethylene glycol. *J. Drug Targeting* **2**: 317-321 (1994).
- 18) Takakura, Y., Masuda, S., Tokuda, H., Nishikawa, M. and Hashida, M.: Targeted delivery of superoxide dismutase to macrophages via mannose receptor-mediated mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 853-858 (1994).
- 19) 高倉喜信, 橋田 充: 遺伝子医薬品の DDS 開発とその問題点, *Drug Delivery System* **10**: 391-398 (1995).
- 20) Miyao, T., Takakura, Y., Akiyama, T., Yoneda, F., Sezaki, H. and Hashida, M.: Stability and pharmacokinetic characteristics of oligonucleotides modified at terminal linkages in mice. *Antisense Res. Develop.* **5**: 115-121 (1995).
- 21) Yoshida, M., Mahato, R. I., Kawabata, K., Takakura, Y. and Hashida, M.: Disposition characteristics of plasmid DNA in the single-pass rat liver perfusion system. *Pharm. Res.* **13**: 597-601 (1996).
- 22) Takakura, Y., Mahato, R. I., Yoshida, M., Kanamaru, T. and Hashida, M.: Disposition characteristics of oligonucleotides in the single-pass rat liver perfusion system. *Antisense Res. Develop.*, in press.
- 23) Sawai, K., Miyao, T., Takakura, Y. and Hashida, M.: Renal disposition characteristics of oligonucleotides modified at terminal linkages in the perfused rat kidney. *Antisense Res. Develop.*, **5**: 279-287 (1995).
- 24) Sawai, K., Mahato, R. I., Oka, Y., Takakura, Y. and Hashida, M.: Disposition of oligonucleotides in the perfused rat kidney: Involvement of scavenger receptors in their renal uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press.

- 25) Mahato, R. I., Kawabata, K., Takakura, Y. and Hashida, M.: *In vivo* disposition characteristics of plasmid DNA complexed with cationic liposomes. *J. Drug Targeting* **3**: 149–157 (1995).
- 26) Mahato, R. I., Kawabata, K., Nomura, T., Takakura, Y. and Hashida, M.: Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes. *J. Pharm. Sci.* **84**: 1267–1271 (1995).
- 27) Takakura, Y. and Hashida, M.: Macromolecular carrier systems for targeted drug delivery: Pharmacokinetic considerations on biodistribution. *Pharm. Res.* **13**: 820–831 (1996).