

201208034A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

人工血小板／H12(ADP)リポソーム：  
臨床研究への移行を目指した品質管理と薬物試験

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠  
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

人工血小板／H12(ADP)リポソーム：  
臨床研究への移行を目指した品質管理と薬物試験

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠  
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

人工血小板/H12(ADP)リポソーム：臨床研究への移行を  
目指した品質管理と薬物試験

(H24- 創薬総合- 一般- 008)

平成24年度  
総括・分担研究報告書

平成25年3月

・・・・・・・・・・・・・・・・研究組織・・・・・・・・・・・・・・・・

(研究代表者)

半田 誠 慶應義塾大学医学部 教授

(研究分担者)

武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授

池田康夫 早稲田大学理工学術院 教授

木下 学 防衛医科大学校 准教授

丸山 徹 熊本大学薬学部 教授

鈴木英紀 日本医科大学 准教授

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

## 目 次

# 人工血小板／H12(ADP)リポソーム：臨床研究への移行を目指した 品質管理と薬物試験

## 平成 24 年度研究報告

### I. 総括研究報告書

半田 誠 .....1

### II. 分担研究報告

#### 1. H12-(ADP)リポソームの標準物性仕様の決定

武岡 真司 ..... 13

#### 2. 負電荷リポソームと活性化血小板の結合能向上のメカニズムの解明

池田 康夫 ..... 75

#### 3. 大量出血合併急性血小板減少家兎モデルにおける H12(ADP)リポソームの投与効果 ー臓器出血後の damage control surgery と H12(ADP)リポソーム投与での救命効果ー

木下 学 ..... 80

#### 4. H12 (ADP) リポソームの体内動態の解析に関する検討

丸山 徹 .....103

#### 5. H12-(ADP)小胞体の安全性評価：血栓誘発性の検討／DIC ラットモデルでの検討

半田 誠 .....112

#### 6. 血小板凝集に巻き込まれた H12-(ADP)リポソームの形態解析

ー急速凍結切断エッチングレプリカ法による未固定試料の検討ー

鈴木 英紀 .....116

#### 7. $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンと H12 担持リポソームの結合解析

鎌田 徹治 .....121

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....131

### IV. 研究成果の刊行物・別冊

## I . 総括研究報告

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業)

人工血小板/H12 (ADP) リポソーム：臨床研究への移行を目指した  
品質管理と薬物試験

総括研究報告書

研究代表者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

**研究要旨**

**【研究目的】** 人工血小板/H12 (ADP) リポソーム (LP) の製造・品質管理体制を確立し、薬物試験 (薬理試験、薬物動態試験、毒物試験) について非臨床データの集積を行い、本試験物の臨床研究への移行の適格性を検証する。

**【研究方法】** LP の製造工程の標準化に向けた物性評価項目を製造ロット毎で検討して、暫定的な品質仕様表を作成した。製造手順書を作成して、温度条件下の保存安定性を検討した。臓器損傷ウサギモデルを用いて大量輸血に伴う急性血小板減少症への適応を実地臨床に則した事後投与プロトコルで評価した。健常マウス、ラット、ウサギの体内動態パラメータを non-コンパートメントモデルで解析し、データのヒトへの外挿を試みた。血栓症誘発・促進作用を DIC ラットモデルで評価した。LP の微細形態解析を、未固定標本を用いて急速凍結切断エッチングレプリカ法で行った。LP と  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の結合測定を LigandTracer 及び Biacore システムで検討し、性能検定法としての有用性を考察した。

**【研究結果・考察】** 21 ロットの測定データに基づいて 5 項目の物性仕様表を作成した。4°C、12 ヶ月保存を目標とするデータが示された。出血性ショックによる致死的帰結に対して、LP は血小板輸血に匹敵する救命効果を示した。LP のヒトでの予測半減期は約 96 時間であった。リポソーム自体にその大量投与で二次線溶の一過性刺激作用が疑われたが、LP による有意な血栓症誘発・促進作用は認めなかった。LP 表面の小孔形成が観察され、内包 ADP の放出ルートが示唆された。Biacore による非標識 LP と精製  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の結合解析系が性能検定法として有用である可能性が示唆された。

**【結論】** LP/人工血小板の臨床研究への移行を目標として、当初の計画通り順調に非臨床データが集積された。

(研究分担者)

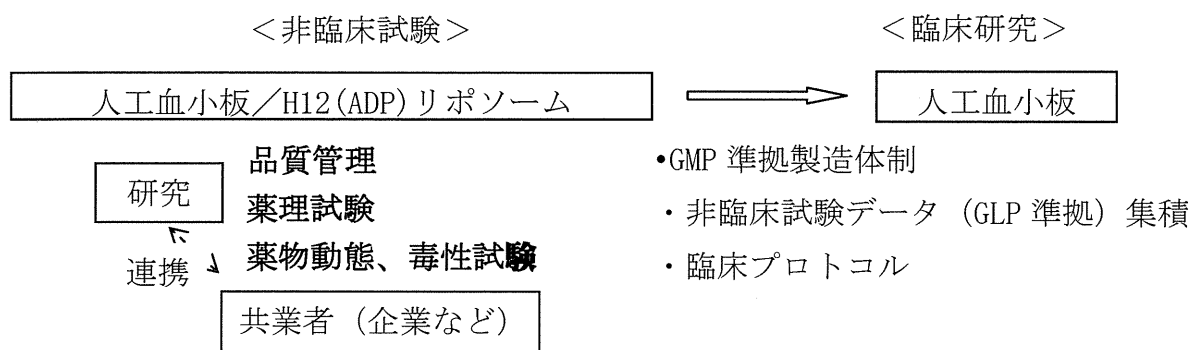
池田康夫	早稲田大学理工学術院 教授
武岡真司	早稲田大学理工学術院 教授
木下学	防衛医科大学校 准教授
丸山徹	熊本大学薬学部 教授
鈴木英紀	日本医科大学 准教授
鎌田徹治	慶應義塾大学医学部 講師

## A. 研究目的

人工血液の開発は、医療の高度化と患者の高齢化に伴う需要の増加および少子化による献血人口の減少に対応した血液製剤の安定供給の確保等に関する法律（血液法）に基づき、官民学が取り組むべき重要な課題とされてきた。とりわけ、保存期間が短く、厳密な保存条件を要し、緊急使用が困難なヒト血小板（献血製剤や iPS 細胞大量培養由来物）に代わる人工物の開発は、欧米においても精力的に行われてきたが、未だに実用化はされていない。我々は、H9 年度より現在まで、厚労科研費の支援及び大学・企業の連携プログラムの協力を得て人工血小板の開発研究を継続し、多くの候補ナノ粒子の中から絞り込まれた H12(ADP) リポソームが、その効力と安全性の面からの前臨床評価により、創薬化が十分可能であると判断するに至った。

本微粒子は、粒子径が 250nm でポリエチレングリコール鎖による表面修飾により十分な血中滞留性と体内排泄性を備え、かつ認識分子としてヒトフィブリノゲンペプチド (H12) を表面に担持させることで止血局所（活性化血小板）特異性を有し、内包化したアデノシン 2 リン酸 (ADP) を血小板凝集依存性に止血局所で放出すること、が特徴である (Okamura Y, et al: J Thromb. Haemost 7:470, 2009). 実際、3 つの異なった機能を有する有機分子 (脂質類、合成ペプチド H12、リボヌクレオチド ADP) で構成された今迄に世界に類を見ない独創的な薬剤であり、かつ本来の人工血液の趣旨に即して生体材料を一切用いないことが特長である (基礎特許：薬物運搬体)。

当該 3 年研究では、担当者との直接接触を介した民間企業との、あるいは大型開発研究費による公的機関との連携を模索しながら、外傷等による大量出血での使用を対象とした臨床研究への移行を目的として、本試験物の品質管理と薬物試験（薬理試験、薬物動態試験、毒物試験）について非臨床試験データの集積を行い、その適格性を検証する（下図）。





## B. 研究方法

### 1. H12(ADP) リポソームの製造および品質管理 (武岡) :

DPPC、cholesterol、DHSG、polyethylen glycol (PEG) -DSPE、H12-PEG-Glu2C18 を、モル比 5/5/1/0.033/0.033 で *t*-ブチルアルコールに溶解後、凍結乾燥させ、ADP 水溶液 (1 mM) と水和させ、押出造粒法 ( $\phi$  2 mm) を用いて粒径を制御し、H12(ADP) リポソーム (粒径  $250 \pm 80$  nm) を製造し、超遠心分離後 PBS に分散させ、ゲルろ過 (Sephadex G25) してリポソーム分散液を調整した。製造物の諸物性 (粒子径、ゼータ電位、脂質膜組成比、ADP 内包量、H12 脂質担持量) をロット毎に測定して、暫定的な物性仕様表を作成した。製造工程の標準化を目的に製造手順書を作成した。また、リポソームの保存安定性について、粒子径、ゼータ電位、ADP 漏出率を各温度条件下 (4°C、25°C、40°C) で 1 ヶ月間評価した。

### 2. 薬効薬理試験 (木下) :

麻酔したウサギの大腿動・静脈から 25 ml の脱血と自己洗浄赤血球/アルブミン溶液の輸血を 8 回繰返すことで最終的に総循環血液量相当の用量交換を行って、大量出血/輸血に合併する希釈性血小板減少症 ( $5 \text{ 万}/\mu\text{l} >$ ) モデルを作成した (Nishikawa K et al: J Thromb Haemost 10: 2137, 2012)。続いて動物を開腹して肝臓に Derma punch で直径 5mm の損傷を作成し、組織欠損箇所を 5 分間小児用尿道カテバルーンで圧迫し、その間に乏血小板血漿 (PPP) に浮遊させた H12(ADP) リポソームやその対照物 : PPP に浮遊させた (ADP) リポソーム、多血小板血漿 (PRP)、PPP 単独を投与し、創部からの持続的な出血を定量的に解析した後、循環容量補正なしにそのまま閉腹して飲水のみで予後を観察した。血算や血液凝固パラメータ、耳介出血時間、Sonoclot を用いた全血凝固能を脱血前、血液交換後、薬剤投与後に適宜測定した。

### 3. 薬物動態試験 (丸山) :

脂質コレステロール及び包含 ADP をそれぞれ  $^3\text{H}$  と  $^{14}\text{C}$  で標識したリポソームを健常マウス、ラット及びウサギに投与してその血中濃度、臓器移行、糞や尿への排泄の動態を解析した。得られた動物の実測パラメータをモーメント解析プログラム (Microsoft Excel) を用いて解析し、測定値をアロメトリック式に外挿して、ヒトにおける体内動態を予測した。また、大量出血時の易出血性病態モデルラットの作製を試みた。

#### 4. 安全薬理試験 (半田) :

血栓症の誘発・促進作用を評価するために、組織トロンボプラスチン試薬 (トロンボチェック PT プラス、Sysmex、ウサギ脳由来) を 60 分間持続投与して作製した DIC ラットモデルを使用した。常用量および高用量のリポソームを投与して、陰性対照と比較して、アンチトロンビンや D-ダイマー等の血液凝固パラメータの変動を測定した。

#### 5. その他の *in vitro* 実験系 (池田、鈴木、鎌田) :

1) リポソームと血小板の結合における陰性荷電の関与 (池田) : 陰性荷電脂質である DHSG の含量を増やしたリポソーム (5/5/5/0.045/0.045) と血小板の相互反応 (結合および凝集) の阻害実験を DHSG アナログ (DMSG) 及び polyacrylic acid (PAA) を用いて行った。

2) リポソームと血小板の相互反応の形態的観察 (鈴木) : 未固定条件下で、急速凍結割断エッチングレプリカ法を用いて、トロンビンで活性化し、あるいは凝集した血小板との反応を透過型電子顕微鏡で観察した。

3) リポソームの機能検定法の検討 (鎌田) : リポソームと活性化血小板上の  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリンとの結合を、LigandTracer 及び Biacore システムを用いて測定した。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. H12 (ADP) リポソームの品質管理及び製造手順書の作製 (武岡)

製造標品 21 ロットで測定した物性評価 5 項目 (粒子径、ゼータ電位、構成脂質濃度、H12 脂質濃度、ADP 内包量) について、信頼区間 95% で統計処理して、リポソームの暫定的な標準物性仕様表を作製した (H24 武岡分担研究報告、Table 2, 3)。大学研究室内のスモールスケール (mg レベル) での製造であるが、リポソーム物性の測定値に大きなばらつきはなかった。各温度条件下 (4°C、25°C、40°C) でのリポソームの保存安定性について 1 ヶ月間評価した結果、粒子径及びゼータ電位は大きな変化は認めなかったが、ADP 漏出率が 40°C にて明らかに増加 (4%) して、当該物性標準仕様表では規格外となった (Figure 1)。今回作成した製造手順書 (H24 武岡分担研究報告、添付) に従い、製造スケールを拡大 (g レベル) することが可能であることがわかった。今回提示した暫定仕様表に、エンドトキシン測定値及び機能評価項目 (定量もしくは半定量値/H24 年度

鎌田分担研究報告書)を加えることで標準仕様表の作成を目指してゆく。また、保存条件については 4℃、12 ヶ月を保証する目的で長期保存試験を行ってゆく必要がある。

## 2. 薬効薬理試験 (木下)

今までの一連の検討により、当該リポソームの薬効については薬剤事前投与(損傷 10 分前)で血小板輸血に匹敵する救命率を得られることを前年度までに明らかにした(Nishikawa K et al: J Thromb Haemost 10: 2137, 2012)。そこで今回は、より実地臨床に合わせて肝臓損傷後に、局所にバルーンカテを挿入して5分間の止血処置(ダメージ・コントロール)を行ないながらの投与(事後投与)プロトコルを検討した(H24年度木下分担研究報告、Figure1-4)。実験動物の循環血液量(100ml)に相当する血液交換(脱血と自己洗浄赤血球輸血を8回繰返す)を行うことで、ヘモグロビン値や白血球数の大きな変動なしで、血小板数は $200 \times 10^3/\mu\text{l}$ から $50 \times 10^3/\mu\text{l}$ に減少し、同時に凝固因子も前値の30%程度に低下して、希釈性血小板減少症/凝固因子欠乏症が安定的に再現できた。常用量の20 mg/kgのH12(ADP)リポソーム/PPP浮遊液(N=10)と比較陽性対照のPRP(多血小板血漿、N=10)と陰性対照のPPP(乏血小板血漿、N=10)の臨床効果を検討したところ、PPP投与群では24時間後までには90%が出血性ショックで死亡したが、それに比較してリポソーム群では6例(60%)が72時間まで生存した。一方、予想に反して、血小板輸血に相当するPRP群では72時間後の生存率が50%とH12(ADP)リポソームと同等かむしろ劣る結果であった(figure 5)。大変興味あることに、ADPを内包していないH12(APBS)リポソームはPPPと同様に臨床効果は認めなかった。このことは、内包化されたADPが観察された止血効果に重要であることを示唆する。実際の肝臓からの出血量を比較すると、最初及びそれに続く5分間とも、陰性対照群(PPP)と比較してH12(ADP)リポソーム群では著明な減少を示したが、PRP群では前の5分間での値がH12(ADP)リポソーム群より劣っていた(Figure 6)。一方、H12(APBS)リポソームは出血量の低減効果は認めなかった。今回の結果は、H12(ADP)リポソームが人工血小板として、緊急処置が必要な大量出血・輸血に伴う希釈性血小板減少症の治療薬剤として実際の実地臨床に利用できる可能性を示した。しかしながら、事前投与と比較して、圧迫止血処置を併用したにもかかわらず、薬剤の事後投与の止血効果は明らかに低かった(72後の救命率:100% vs 60%)。陽性対照の血小板

輸血 (PRP 群) でも同様の結果であったことから、モデル作成プロトコルや薬剤投与スケジュールの変更等を検討してゆく必要があるかもしれない。また、実臨床では標準となっている併存する凝固障害 (特に低フィブリノゲン血症) への対応も考慮に入れる必要があるかもしれない。

### 3. 薬物動態試験 (丸山) :

健常のマウス、ラット、ウサギで得られた H12 (ADP) リポソームの体内動態パラメータについて、より標準的な non-コンパートメントモデルによる再解析を行った。その結果、2-コンパートメントモデルによる解析値 (H23 年度丸山分担報告書) と比較して、ラットのみ異なった値を示したが、それらの値をアロメトリック式に外挿して、ヒトにおける半減期をおよそ 96 時間と予測することができた。2-コンパートメントモデルによるヒトの予測半減期はおよそ 18 時間であったことから、当該薬物が十分な薬効持続性を有する可能性が示された。また、今回、PK/PD 解析に用いる目的で、ラットを用いてウサギと類似した急性出血モデルの作成が試みられた。

### 4. 安全薬理試験 (半田) :

組織因子誘発性の DIC ラットモデル (凝固優位型) で、最も危惧される血栓症の誘発・促進効果について検討した。常用量 (20mg/kg) と高用量 (40mg/kg) 投与による血小板数と血栓症パラメータ (アンチトロンビンと D-ダイマー) の時間経過による変動は、陰性対照 (生食群) と比較して差がなかった。一方、大量用量 (80mg/kg) 群においては、投与後 30 分で一過性の D-ダイマーの上昇傾向が認められた (H24 年度半田分担研究報告、Figure 2)。さらに、H12 未修飾・ADP 未内包リポソーム投与群 (80mg/kg) でも同様の傾向が認められた。その変動はばらつきが多く統計学的に有意ではないが、このような血栓準備状態においては、リポソームそれ自体が線溶系 (二次線溶) を亢進させる作用がある可能性を示している。例えば、線溶優位型の LPS 誘発性 DIC モデルなどを用いた精査がさらに必要であろう。

### 5. その他の *in vitro* 実験 (池田、鈴木、鎌田)

1) リポソームと血小板の結合における陰性荷電の関与 (池田) :  
活性化血小板と H12 なしで結合できる DHSG 陰性荷電増量リポソームの作用メカ

ニズムをDMSG及びPAAを用いた阻害実験で検討した。当該リポソームによるADP惹起血小板凝集増強効果及び活性化血小板へのリポソームの結合促進現象(FACS)は、DMSG存在下では阻害されなかったが(H24年度池田分担研究報告、Figure 2、3)、PAAでは用量依存性に阻害された(Figure 4、5)。

2) リポソームと血小板の相互反応の形態的観察(鈴木)：急速凍結切断レプリカ法による電顕解析で、血小板凝集に巻き込まれたリポソームはラグビーボール様の楕円形に変形し、一部ではその表面に小孔様の穴が観察された(平成23年度鈴木分担研究報告)。リポソームからのADP放出は血小板凝集に依存性であることから、凝集に伴う相互の接着力に関連した物理的変化を受けて脂質膜が攪乱された漏出の結果ではないかと想像されてきた。しかしながら、標本固定によるアーチファクトの疑いが指摘されていた。そこで今回は、急速凍結切断エッチングレプリカ法を用いて、未固定条件化で形態的解析を行った。その結果、凝集反応時間が制御できなかったものの血小板凝集に巻き込まれたリポソームの一部でその表面に小孔様の穴が散見され、ADP放出のメカニズムを示唆する結果が再確認された。

3) リポソームの機能検定法の検討(鎌田)：LigandTracerを用いた $\alpha$ IIb $\beta$ 3安定発現細胞株とFITC標識H12リポソームの結合測定法、及びBiacoreを用いた精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3と非標識H12リポソームの直接結合を測定する無細胞系の測定法の欠点と利点が試行された。前者はリポソームの標識が必須であること及び細胞株の安定性への危惧があることから測定系としては適していない。一方、後者は無細胞系であり、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3精製標品の品質が確保できれば安定的な評価が可能である。

#### D. 結論

3年後の臨床研究への移行を目標として、品質保証、製造体制の確立へのステップを順調に踏み、H12(ADP)リポソームの人工血小板としての適格性を示唆する非臨床試験データが集積できた。薬効薬理試験では急性出血への適応を支持する成績が得られた。薬物動態試験ではヒト体内で十分な半減期を有することが予測された。安全薬理試験で危惧される血栓症誘発・促進作用は認めなかった。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(原著)

#### 1. 論文発表

- (1) Nishikawa K, Hagiwara K, Kinoshita M, Shono S, Katsuno S, Doi M, Yanagawa R, Suzuki H, Iwaya K, Saitoh H, Sakamoto T, Seki S, Takeoka S, Handa M. Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. *J Thromb Haemost* 10: 2137-2148 (2012)
- (2) Tokutomi K, Tagawa K, Korenaga M, Chiba M, Asai T, Watanabe N, Takeoka S, Handa M, Ikeda Y, Oku N : Ability of fibrinogen  $\gamma$ -derived dodecapeptides with different sequences to bind to rat platelets. *Int J Pharm* 438: 296-301, 2012
- (3) Taguchi K, Ujihira H, Katsuno S, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T: Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen g-chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Drug Metab Disp* (in press)
- (4) Kamata T, Handa M, Takakuwa S, Sato Y, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin. *PLoS ONE* (in press)

(総説)

- (1) 岡村陽介、半田誠 : ナノ粒子と血小板の相互作用／完全人工系血小板代替物への応用を目指して. *Int Rev Thromb* 8:34-41 (2013)

#### 2. 学会発表

- (1) Tan M, Arai M, Watanabe N, Handa M, Ikeda Y, Takeoka T:「Inhibitory study on the binding of high anionic liposome to the activated platelet membrane」, 2nd International Conference on Biomaterial Science (2013. 3., つくば)
- (2) 藤山 敦史, 池田 康夫, 武岡 真司 : 「血小板代替物 H12-(ADP)リポソームの物理化学的評価法の確立」, 第 19 回日本血液代替物学会年次大会

(2012.10., 北海道)

- (3) 西川可穂子、木下 学、萩沢康介、土井麻実、宮崎裕美、小野聡、阪本敏久、齋藤大蔵、関修司：人工血小板 H12(ADP)リポソームを用いた血小板減少病態時の臓器外傷部位における止血制御の有効性（出血後投与による検討）．第 27 回日本 shock 学会総会 2012, 東京.(日本 Shock 学会雑誌, p76: 27, 2012)
- (4) 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川錬平、土井麻実、武岡真司、齋藤大蔵、関 修司、西田育弘：大量出血後輸液による血小板減少状態下で進行する肝外傷出血に対して H12(ADP)liposome 同時投与は血小板投与と同等の止血および救命効果を有する．第 19 回日本血液代替物学会(シンポジウム 2-4) 2012, 札幌.(人工血液 p19: 20 2012)
- (5) 土井麻実、木下 学、西川可穂子、萩沢康介、柳川錬平、半田 誠、池田康夫、武岡真司：血小板減少病態時における H12(ADP)liposome の止血能に果たす H12 ドデカペプチドの役割について（出血前投与による検討）．第 19 回日本血液代替物学会（シンポジウム 2-4）2012, 札幌.(人工血液 p18: 20 2012)
- (6) 木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川錬平、西山靖将、半田 誠、関 修司：血小板代替物 H12(ADP)liposome 開発の必要性—大規模震災時への対策の 1 つとして—．第 19 回日本血液代替物学会(シンポジウム 2-4) 2012, 札幌.(人工血液 p20: 20 2012)
- (7) 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川錬平、西田育弘、関 修司、齋藤大蔵：人工血小板を用いた重症外傷での止血制御．第 90 回日本生理学会（シンポジウム 3 重度外傷と免疫・生理学—基礎から臨床まで—．2013, 東京（J. Physiol. Sciences. 63; S27, 2013）
- (8) 丸山徹、田口和明、氏平隼人、渡邊博志、新井愛美、池田康夫、武岡真司、半田誠、小田切優樹 血小板代替物 H12(ADP)リポソームの体内動態に及ぼす血小板減少症の影響（第 19 日本血液代替物学会年次大会 2012 年 10 月 26 日）
- (9) 鈴木英紀、諸根信弘：ヒト血小板と人工血小板粒子の相互作用の解析—急速凍結切断レプリカ法による検討—．日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会．2012.5.14-16, つくば．
- (10)Kamata T, Handa M, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Divalent cations define the structural requirement for activation in  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin. The 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No.7,887,837“DRUG DELIVERY MATERIAL”



## Ⅱ. 分担研究報告

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業: 政策創薬総合研究事業総合研究事業)  
分担研究報告書

## H12-(ADP)リポソームの標準物性仕様の決定

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)  
研究協力者 土井 麻実 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)  
藤山 敦史 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)

### 【研究要旨】

フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させた H12-リポソームは、活性化血小板間を GPIIb/IIIa を介して架橋することにより血小板凝集形成に関与する。更に内水相に血小板凝集惹起物質である adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた H12-(ADP)リポソームは、血小板凝集塊中で放出された ADP が血小板を活性化させて血小板凝集形成を促進することにより止血能顕著に向上できる。

本分担研究者は、H12-(ADP)リポソーム試験物の製造と分担研究者への提供を担当しており、本年度は、配布用に調製した 21 ロットの試料に関して諸物性を測定し、標準物性仕様を決定した。また、H12-(ADP)リポソーム試料の製造手順書を作成し、各製造工程の標準化を行った。また、H12-(ADP)リポソームの物理化学的安定性を確認するために、H12-(ADP)リポソームを 4 °C、25 °C、40 °C の条件にて 1 ヶ月間保存し、物性(粒子径、ゼータ電位、ADP 漏出率)について経時的に測定を行った。

### A. 研究目的

リポソーム表面の PEG 鎖末端にフィブリノーゲン $\gamma$ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を導入し、その内水相に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた H12-(ADP)リポソームは、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成を促進させながら、血小板凝集塊中で ADP を放出する。現在までに、血小板数を減少させた実験動物に静脈投与して出血時間を測定した場合に顕著な止血能が確認されている<sup>1),2)</sup>。

分担研究者らは、H12-(ADP)リポソームの調製と提供を担当しており、これまで濃度、

粒子径、ゼータ電位の 3 項目であった物性評価項目に加えて、平成 23 年度には、H12-(ADP)リポソーム試験物の機能性部位である H12 の含有量、内包 ADP 量および脂質構成比を新たな物性評価項目として測定方法の確立を行った<sup>3)</sup>。本年度(平成 24 年度)は、試験物の製造管理項目ならびに品質管理項目を検証方法も含めて精査し、製造管理法を確立する。

1) Okamura, Y. et al. *J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).

2) 平成 18, 19, 20 年度 政策創薬総合研究事業研究報告書

3) 平成 23 年度 創薬基盤推進総合研究事業分担研究報告書

## B. 研究方法

### 1. H12-(ADP)リポソームの作製

各脂質 (DPPC/Cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub>=5/5/1/0.033/0.033 (by mol))を秤量後、t-ブチルアルコールに溶解させ凍結乾燥 (6 時間)にて混合脂質を得た。この混合脂質粉末に対して 1mM ADP 溶液(in PBS)を 2 wt%の最終濃度になる様に加えて水和後(3 hr, r.t.)、エクストルージョン法( $\phi$  0.2  $\mu$ m)にて粒径を制御、超遠心分離にて精製した(100,000 g, 30 min, 4°C)。次いで、これを PBS に再分散、ゲル濾過精製し (Sephadex G25)、H12-(ADP)リポソームを得た。

### 2. H12-(ADP)リポソームの物性評価

#### 2.1. 粒子径、ゼータ電位の測定

調製したリポソームについて、N4 Plus(Beckman Coulter 社)を用いて粒子径を、Zetasizer nano (Malvern 社)を用いてゼータ電位を測定した。

#### 2.2. 脂質膜組成比の測定

凍結乾燥および真空乾燥後の H12-(ADP)リポソームを重クロロホルム(ca. 1.5 mL)に溶解させ <sup>1</sup>H-NMR 測定を行い、各構成脂質に特異的なスペクトル(**Table 1**)を用いて解析を行った。解析に際しては、Cholesterol にのみ特徴的なスペクトル 5.35 ppm(1H, s, -CCHCH<sub>2</sub>-)を積分比の基準とし、各脂質の混合比を算出した。尚、PEG-DSPE と H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub> は含有量が少ないことから、共通の PEG 繰返しユニットのピークを用いることとし、PEG 比のみでの算出した。

**Table 1** Characteristic spectrum.

Lipid	Characteristic spectrum
DPPC	5.20 (q, 1H, -CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -)
Cholesterol	5.35 (d, 1H, -CCHCH <sub>2</sub> -)
DHSG	4.52-4.71 (dd, 1H, -COONHCHCH <sub>2</sub> -)
PEG-DSPE	3.65 (m, 456H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -)
H12-PEG-Glu2C <sub>18</sub>	3.65 (m, 312H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -)

#### 2.3. 内包 ADP 量の測定

H12-(ADP)リポソームを等量の n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (0.5 M)にて可溶化し、HPLC (TSK Gel ODS-100V, 1 mL/min, Ab. 260 nm, リン酸 (pH=7.0)/メタノール =97/3(v/v) (TEA 30 mM))にて ADP 標準試料 (1, 0.75, 0.5, 0.1 mM)と共に測定し、ADP ピーク面積の測定値から ADP 濃度を測定した。また、リン脂質 C-テストワコーにて算出した H12-(ADP)リポソーム濃度をもとに、濃度あたりの ADP 量として算出した。

#### 2.4. H12 脂質担持量の測定

10  $\mu$ l の H12-(ADP)リポソームに等量の n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (0.5 M)を加え、可溶化した後、150  $\mu$ l のホウ酸緩衝液 (pH9.0)および 50  $\mu$ l のフルオレスカミン溶液(0.1 mg/mL)を添加、攪拌し、蛍光強度を測定し、検量線から濃度を定量した。また、H12-(ADP)リポソーム濃度をもとに、単位濃度あたりの H12 脂質担持量として算出した。

### 3. H12-(ADP)リポソームの保存安定性試験

H12-(ADP)リポソーム(20 mg/ml)を 4 °C、25 °C、40 °C の条件にて 1 ヶ月間保存し、物性(粒子径、ゼータ電位、ADP 漏出率)について経時的に測定を行った。

粒子径、ゼータ電位については 2.1. に示した方法にて測定した。他方、ADP 漏出率については H12-(ADP)リポソームを Amicon

Ultra-0.5 を用いて限外濾過(20,000 G, 10 min)し、濾液を回収後、2.3.に示した HPLC 測定条件にて ADP 量を測定し、さらに全内包 ADP 量に対する割合を算出し、漏出率とした。

## C. 研究結果及び考察

### 1. H12-(ADP)リポソームの標準物性仕様の決定

#### 1.1. H12-(ADP)リポソームの諸物性

**Table 2** に本年度試験物として製造し、分担研究者に配布した H12-(ADP)リポソーム標品 21 ロットの諸物性のまとめを示す。これより、当研究室で調整された H12-(ADP)リポソームの物性に、大きなばらつきがないことが確認された。

**Table 2** Physical properties of H12-(ADP)liposomes

	Diameter (nm)	z-potential (mV)	H12/Lipid(mg/mg)	ADP/Lipid(mmol/g)
Mean	233.56±71.39	-9.28	2.18 x10 <sup>-2</sup>	0.33 x10 <sup>-2</sup>
S.D.	13.46±21.90	0.68	0.58 x10 <sup>-2</sup>	0.05 x10 <sup>-2</sup>
Lipid ratio analysis				
	DPPC	Cholesterol	DHSG	PEG
Mean	4.89	5.00	0.92	0.028
S.D.	0.17	0.00	0.17	0.0031

#### 1.2. H12-(ADP)リポソームの標準物性仕様

**Table 2** で示した各諸物性を信頼区間 95 %にて統計処理し、H12-(ADP)リポソームの標準物性仕様を決定した(**Table 3**)。今後は、この仕様を満たす試験物のみを提供することを決定した。

**Table 3** Specs of physical properties of H12-(ADP)liposomes.

Items	Range
Diameter	210 ~260 nm
Distribution	< 100 nm
z-potential	-7.0 ~-11.0 mV
Cholesterol	5
DPPC	4.7~5.1
DHSG	0.8~1.2
PEG-lipid	2.5 x10 <sup>-2</sup> ~3.5 x10 <sup>-2</sup>
H12/Lipid	1.5 x10 <sup>-2</sup> ~3.0 x10 <sup>-2</sup> mg/mg
ADP/Lipid	0.25 x10 <sup>-2</sup> ~0.45 x10 <sup>-2</sup> mmol/g

### 1.3. 試験物の製造手順書

H12-(ADP)リポソーム試験物を 21 ロット製造する間のプロセスの文書化を進め製造手順書を作成した(添付)。本手順書は、1) H12-(ADP)リポソームの概要、2) H12-(ADP)リポソームの製造工程の全体の流れ、3) 各製造工程フローチャート、4) H12-(ADP)リポソーム製造の詳細な標準手順、5) H12-(ADP)リポソーム物理化学的評価の詳細な標準手順からなる。以上より、各製造工程の標準化を行った。

### 2. H12-(ADP)リポソームの保存安定性試験

#### 2.1. 粒子径、ゼータ電位および ADP 漏出率について

H12-(ADP)リポソームを 4 °C、25 °C、40 °C の条件にて 1 ヶ月間保存した場合、粒子径、ゼータ電位はいずれの条件でも大きな変化はみられなかった(**Figure 1(a), (b)**)。しかし、ADP 漏出率は 40 °C 保存の場合わずかに増加し、1 か月間で 4 %の漏出が確認された(**Figure 1 (c)**)。この結果より、6 ヶ月保存では約 24 %の ADP 漏出率が予想され、これは **Table 3** にて定めた規格外となる。よって 6 ヶ月間以上の長期の使用期限を設定する場合、室温または冷蔵保存が望ましい。本予備検討を受け、次年度(平成 25 年度)では、専用の恒温湿槽を用いた長期保存試験、加速試験(25°C±2°C/60% RH±5% RH、6 か月)を実施、5°Cでの保存期間(12 か月)を保証する。