

Figure 1 Results of stability test of H12-(ADP) liposomes for 1 month. (a) Changes of diameters, (b) Changes of z-potentials, (c) Changes of ADP leakages

D. 結論

(1) H12-(ADP)リポソームの物性(粒子径、ゼータ電位、脂質膜組成比、内包 ADP 量および H12 脂質担持量)について標準物性仕様を決定した。

(2) H12-(ADP)リポソームの製造手順書を作

成した。

(3) H12-(ADP)リポソームの保存安定性を予備的に評価し、本格的な保存安定性試験のための条件を決定した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No.7,887,837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

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)

H12-(ADP)リポソーム

(人工血小板)

製造手順書

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 先進理工学研究科)

藤山 敦史 (早稲田大学 先進理工学研究科)

目次

人工血小板 H12-(ADP)リポソームの概要.....	1
人工血小板 H12-(ADP)リポソームの製造工程.....	5
全行程フローチャート.....	5
1. H12-(ADP)リポソーム製造の詳細な標準手順	
1-1 オートクレーブ滅菌.....	15
1-2 混合脂質の作製.....	17
1-3 水和.....	19
1-4 エクストルージョン.....	22
1-5 超遠心分離・再分散.....	25
1-6 ゲルろ過・精製.....	27
1-7 濃度の決定.....	29
2. H12-(ADP)リポソーム物理化学的評価の詳細な標準手順	
2-1 粒子径の測定.....	32
2-2 ゼータ電位の測定.....	36
2-3 ADP 内包量の測定.....	41
2-4 ADP 漏出量の測定.....	47
2-5 脂質組成比の測定.....	51
2-6 H12-PEG-Glu2C ₁₈ の定量.....	54

人工血小板

H12-(ADP)リポソームの概要

H12-(ADP)リポソーム

平成 24 年 早稲田大学 武岡研究室作成

【組成・性状】

1. 組成

本剤は、フィブリノゲン γ 鎖 C 末端ペプチド (H12)を担持し、さらに血小板を活性化させる ADP を内包した直径 230nm 程のリポソーム製剤である。(図 1)

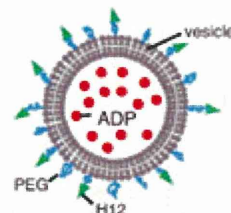


図 1 H12-(ADP)リポソーム

有効成分：ADP(Adenosine 5'-diphosphate),H12-PEG-Glu2C18(fibrinogen γ -chain dodecapeptide (C-HHLGGAKQAGDV, Cys-H12) was conjugated to the end of the PEG-lipids)

添加物：DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine),Cholesterol, DHSG(1,5-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate),PEG-DSPE(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-[monomethoxypoly(ethyleneglycol)])

2. 性状

白濁液。無臭。

【効能・効果】

先天性または抗がん剤治療などによる低血小板状態に陥っている患者に静脈投与することによって出血リスクを低減させる。あるいは大量出血状態の患者に静脈投与することによって止血を促す。

【薬効薬理】

1. 作用機序

活性化血小板に H12 を介して特異的に結合し、出血部位に存在する活性化血小板同士を架橋する。これにより血小板の凝集形成を促進し、かつ内包 ADP を血小板凝集塊中で放出することで、血小板凝集を促進し止血効果をもたらす。(図 2)

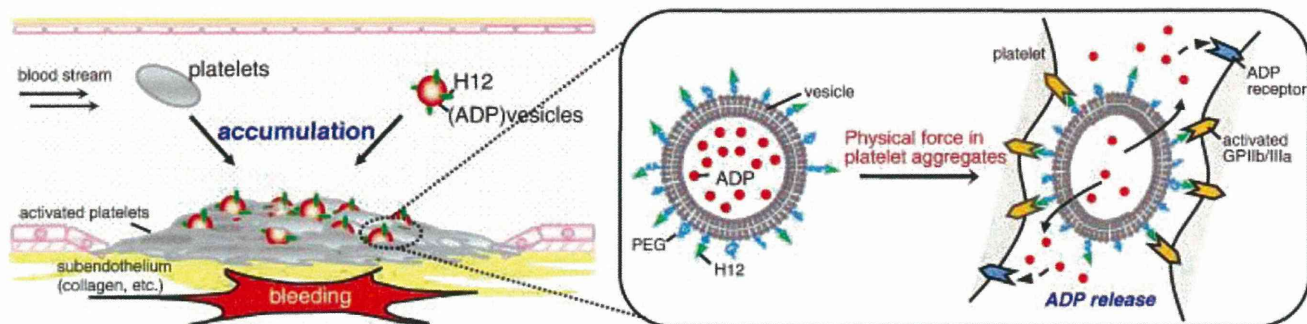


図1 H12-(ADP)リポソームの作用機序

2. 薬理作用

1) 活性化血小板表面の GPⅡb/Ⅲa を特異的に認識する。

リポソーム上に担持されたフィブリノゲンγ鎖C末端ペプチド(HHLGGAKQAGDV:H12)は活性化血小板上に発現される GPⅡb/Ⅲa を認識、架橋し血小板凝集を促進する機能を持つ。これにより、出血部位特異的にリポソームが集積する。

2) 内包ADPの放出により血小板の活性化する。

血小板凝集塊に巻き込まれたリポソームより放出されたADPは、活性化血小板上のADP受容体に作用し、一次凝集と二次凝集を引き起こす。血小板のADP受容体には、P2Y1とP2Y12の二つのサブタイプが存在し、P2Y1は血小板の形状変化(一次凝集)に係わり、P2Y12は血小板からのADP放出や血小板の凝集維持(二次凝集)に強く関連する。

【有効成分に関する理化学的知見】

1.

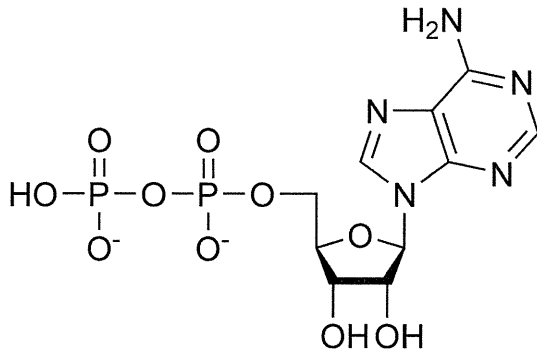
一般名：**ADP**

化学名：Adenosine 5'-diphosphate

組成式： $C_{10}H_{13}N_5O_{10}P_2 \cdot Na_2$

分子量：471.2

化学構造式：



性状：白色の結晶で水溶性を示す。

2.

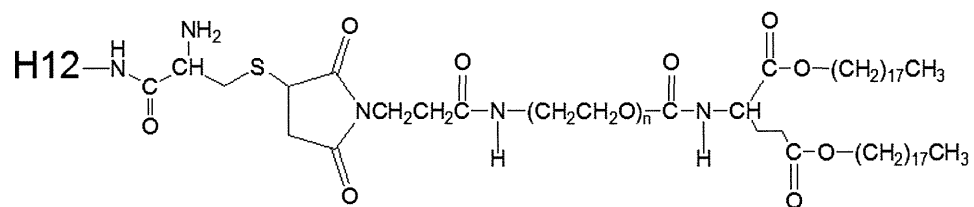
一般名：**H12-PEG-Glu2C18**

化学名：

組成式：

分子量： $\overline{M_w} = 5179$

化学構造式：



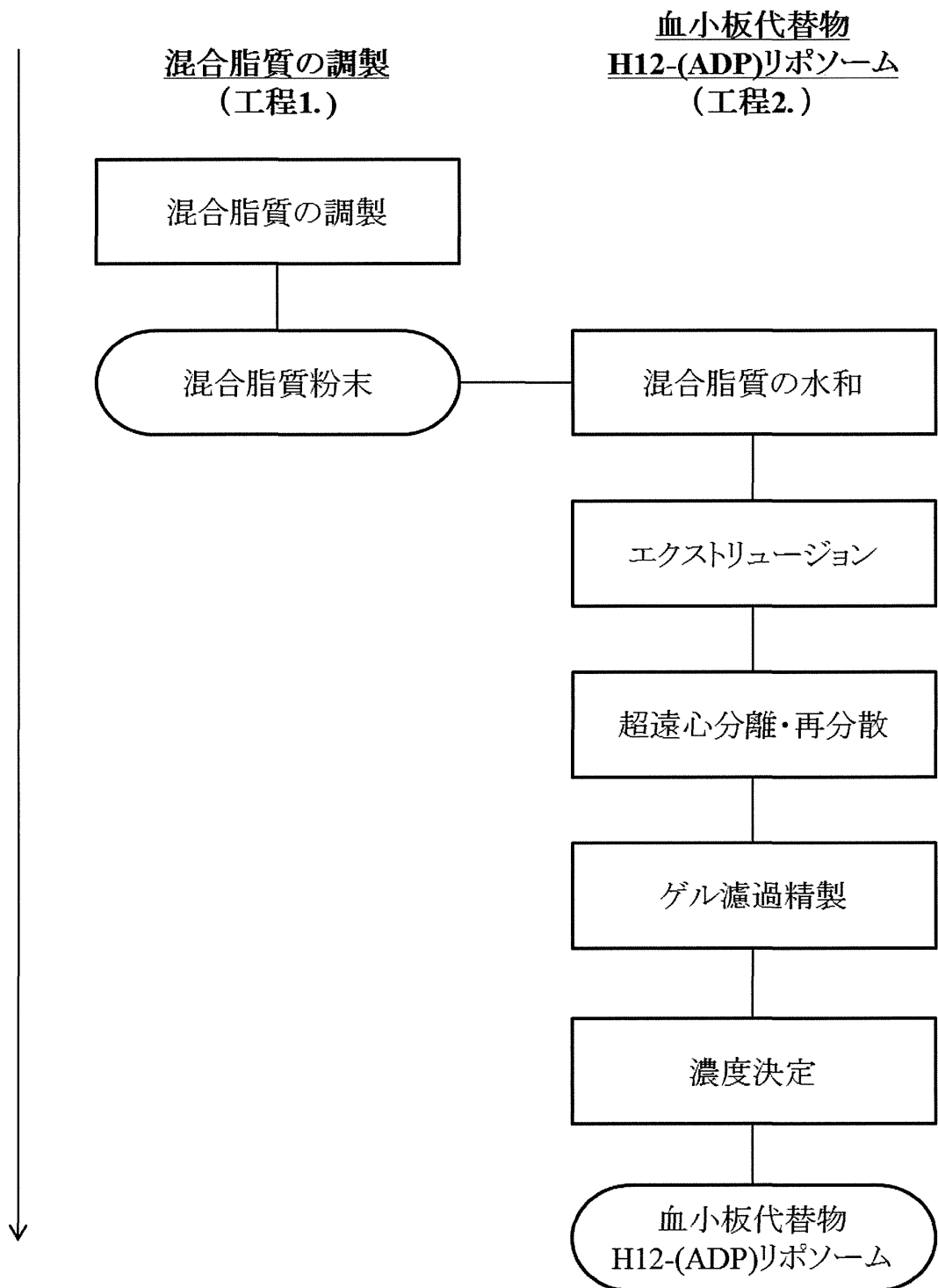
性状：白色粉末。

【主要文献】

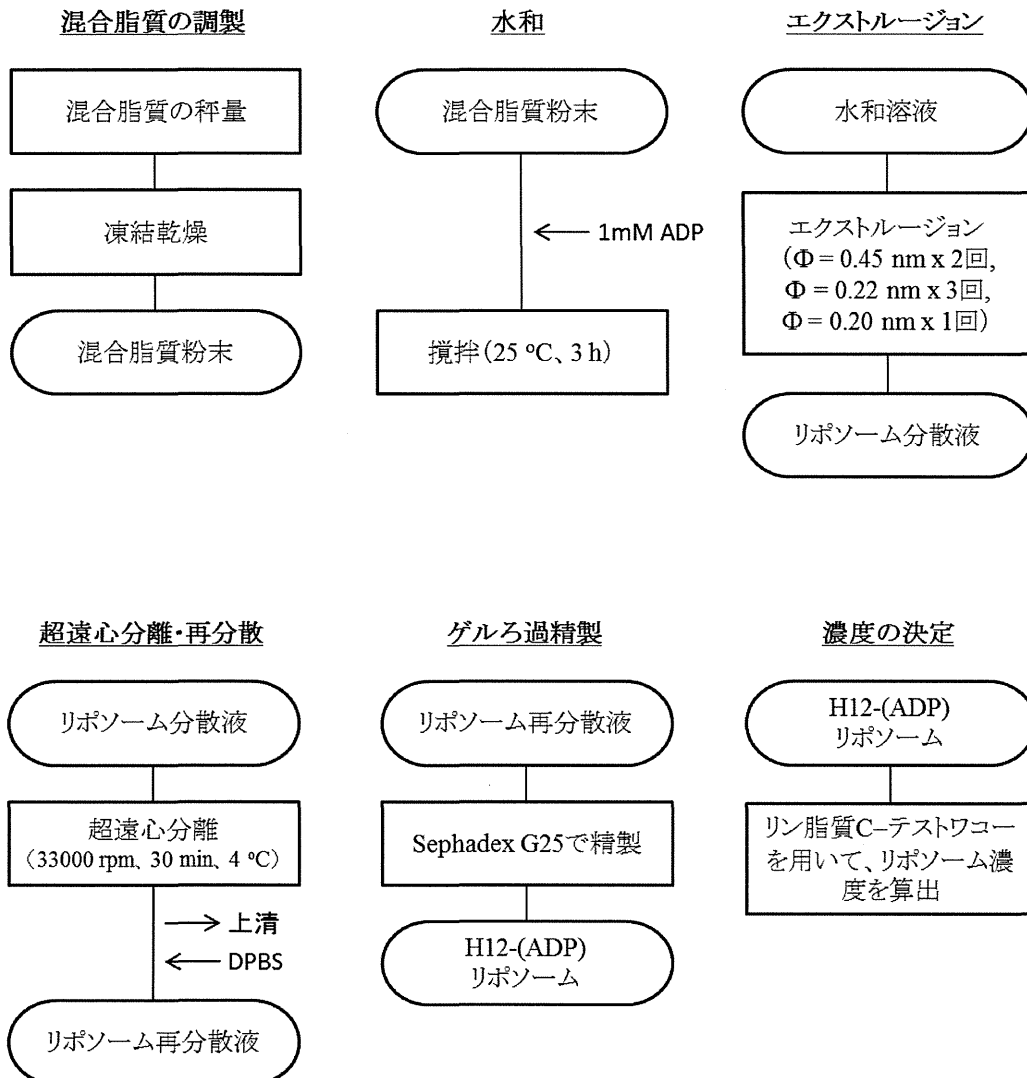
- 1) Y. Okamura *et al.*, *Bioconjug Chem.*, **16**, 2005, 1589-96.
- 2) Y Okamura *et al.*, *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 2009, 470-477.
- 3) Y Okamura *et al.*, *J. Controlled Release*, **148**, 2010, 373-379.
- 4) K Nishikawa *et al.*, *J. Thromb. Haemost*, **10**, 2137-2148

人工血小板
H12-(ADP)リポソームの製造工程
のフローチャート

全工程のフローチャート



各工程のフローチャート



1日目:オートクレーブ、混合脂質作製

9:00

オートクレーブにかける器具をすべて洗浄する

9:15

純水に一度浸した各フィルターを、フィルターの種類ごとに純水で置換したアルミホイルで包む

フィルターを包んだアルミホイルを入れた順番が分かるように、純水を入れた500mlビーカーに洗める

エクストルーダーの部品(ゴムパッキン、ホース、鉄のフィルター)は純水を入れた200mlビーカーに入れ、固定用のねじはアルミホイルで包む

オートクレーブバックも純水で置換し、金属とその他に分け、それぞれ道具を入れ、口をしぼる

パストゥール、遠心用チューブはそれぞれ金属容器に入れる

10:30

オートクレーブ内部のかごにそれぞれのオートクレーブバックを入れ、スイッチを入れる(121度、20分)

1日目:オートクレーブ、混合脂質作製

10:45

・使用器具の洗浄
・電子天秤の補正
・凍結乾燥機の電源を入れ、冷却機能をONにする
・*t*-BuOHを加温し、液状にする

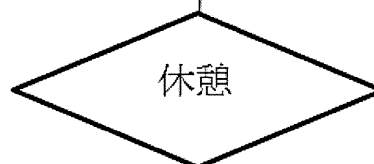
11:20

・凍結乾燥機の真空ポンプを作動させ、内部を真空状態にする。
・各脂質をデシケーターに入れ、解凍させる。

11:30

～

12:30



12:30

オートクレーブから器具を取り出し、クリーンベンチ内へ入れる。

各脂質を秤量し、ナスフラスコに入れる。

t-ブチルアルコールをパスツールで適量加え、各脂質を溶解する

洗面器にアセトンを入れ、ドライアイスで氷冷し、氷冷したアセトン中で、ナスフラスコを回転させ、混合脂質を凍結させる

15:00

ナスフラスコを凍結乾燥機に接続し、アルミホイルで遮光(遮熱)する。(終夜、翌日の9:00まで)

15:30

使用器具を洗浄する。

2日目:水和、エクストルージョン、超遠心分離・再分散

9:00

・ADPを冷凍庫から取り出し、デシケーターで解凍させる
・電子天秤の補正を行う

9:20

混合脂質を凍結乾燥機から、ADPをデシケーターから取り出し、秤量する

(以下、クリーンベンチ内での操作)

9:50

使用する器具(ピンセット、ナスフラスコ、スターラー、葉さじ)をPBSで置換をし、キムワイプでふきとる。

ADPをPBSに溶解し、1mMADP溶液を調製する。

水和時に必要なナスフラスコ、スターラーを1mMADP溶液で置換し、ナスフラスコの口をキムワイプでふきとる。

ピンセットでスターラーをナスフラスコに入れ、このナスフラスコに秤量した混合脂質を入れる

10:50

1mM ADP溶液をナスフラスコへ入れる

攪拌機上にナス台を固定し、3時間攪拌をする。このときナスフラスコの口をパラフィルムで覆う。

10:50

～

13:50

休憩をとりながら、30分おきに水和の状態を確認し、混合脂質のかたまり等がないよう注意する。

2日目:水和、エクストルージョン、超遠心分離・再分散

13:50

オートクレーブバックから取り出した使用器具
(エクストルーダー等)をPBSで洗浄したのち、
1mM ADP水溶液で置換する。

$\Phi=0.45$ フィルターを1mM ADP水溶液で置
換し、上が表になるようにピンセットを用いて
セットし、エクストルーダーを組み立てる。
エクストルーダーと窒素ポンペをつなげる。

15:00

手順書2-3(3~17)の要領でエクストルージョンを行
い、リボソームの粒径制御を行う

エクストルージョン後のサンプルを6本の超遠
心用チューブに1.5mlずつ分注する。

超遠心用チューブにほぼ満水までPBSを入れ、
チューブ内に空気が入らないようにキャップをしめる

15:50

超遠心機にて33000rpm,4°Cの条件で30分遠
心をする。

遠心が終わったらチューブを取り出し、上澄み
のPBSをパスツールピペットを用いて除去する。

6本中、3本の遠心用チューブに1mlずつPBS
を加え、洗んだリボソームをパスツールピペッ
トを用いて再分散させる。

16:30

再分散液を1つの遠心チューブにまとめ、
PBS500 μ Lを用いて空になった遠心チューブ
全てを洗浄し、洗浄後の液は再分散液に加え
る。

17:00

(以下、クリーンベンチ外での操作)

使用器具をクリーンルームから出し、洗浄する

3日目:ゲル濾過精製、濃度の決定

9:00

Sephadex G25の先端をはさみで切り、下図のようにセットする。もともと入っている溶液を全て下部より排出した後、上部よりPBS5mlを加え、ゲルを置換する。この操作は計4回行う。

9:45

PBSで置換し終わったSephadex G25をセットする

再分散後のサンプルを1mL加える

11:20

排出された溶液が約3ml溜まったところで、リポソームが存在している白濁液をおよそ1.5ml回収する。

11:30

～

12:30

休憩

12:30

(以下、クリーンベンチ外での操作)

手順書2-6 1～2の行程に従い、可溶化サンプルを作製する。

手順書2-6 3～5の行程に従い、検量線サンプル、測定サンプルを作製する。

37℃に加温した恒温槽に、各検量線サンプルと調製工程5で作成した各可溶化サンプルを入れ、10分静置する。

14:00

調製工程6で作成した各サンプルを96wellプレートに1wellに200μLずつ各3well入れる。

マイクロプレートリーダーで600 nmの波長で吸光度を測定する。

3日目:ゲル濾過精製、濃度の決定

14:10

測定された検量線サンプルの吸光度を用いて、検量線を作成する。

作成した検量線に各可溶性サンプルの吸光度を代入すると、可溶性液中のDPPC濃度が算出されるので、その濃度よりリポソーム濃度を算出する。

15:00

(以下、クリーンベンチ内での操作)

測定した濃度をもとに、PBSを用いて必要濃度に希釈をする。

作製したサンプルにラベルをし、パラフィルムでふた周辺を巻いたあと、冷蔵保存(4°C)する。

15:30

クリーンベンチ内を清掃し、70%エタノールで内部を拭く。

16:00

(以下、クリーンベンチ外での操作)

使用器具を洗浄し、定位置へ戻す。

人工血小板

H12-(ADP)リポソームの製造と評価 に係る標準手順

1. H12-(ADP)リポソーム製造の詳細な標準手順	
1-1 オートクレーブ滅菌	15
1-2 混合脂質の作製.....	17
1-3 水和.....	19
1-4 エクストルージョン	22
1-5 超遠心分離・再分散.....	25
1-6 ゲルろ過・精製	27
1-7 濃度の決定.....	29
2. H12-(ADP)リポソーム物理化学的評価の詳細な標準手順	
2-1 粒子径の測定.....	32
2-2 ゼータ電位の測定.....	36
2-3 ADP 内包量の測定.....	41
2-4 ADP 漏出量の測定.....	47
2-5 脂質組成比の測定.....	51
2-6 H12-PEG-Glu2C ₁₈ の定量.....	54

工程 No. 1-1	工程	オートクレーブ滅菌
------------	----	-----------

1.概要

使用機器をオートクレーブにかけ、滅菌する。

2.原料

原料	量	入手先
純水	適量	Q-POD EDS, Milli-Q Advantage

3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
オートクレーブバッグ	2	A-BAG950	IWAKI
薬さじ	2		
ピンセット	1		
スターラー	2		
ナスフラスコ	2		
エクストルーダー	1		
Φ=0.45 フィルター	5	HAWP02500	MILLIPORE
Φ=0.22 フィルター	5	GSWP02500	MILLIPORE
Φ=0.2 フィルター	5	110606	Whatman
アルミホイル	1		住軽アルミ箔
500ml ビーカー	1		
200ml ビーカー	1		
オートクレーブ	1	HV-50	HIRAYAMA
超遠心用チューブ	10	361623	BECKMAN COULTER
パスツールピペット	5	1K-PAS-9P	IWAKI

4.操作手順

		<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
1 日目			
9:00	1	<p>使用器具の洗浄</p> <p>オートクレーブにかける道具は、すべて中性洗剤で洗ったあと、水道水で十分にすすぎ、純水で置換をする。</p>	汚れの有無は目視でも確認すること。
9:15	1	<p>滅菌工程</p> <p>純水に一度浸した各フィルターを、フィルターの種類ごとに純水で置換したアルミホイルで包む。</p>	
	2	<p>フィルターを包んだアルミホイルを、純水を入れた500mlビーカーに沈める。その際、入れた順番が分かるように記録する。</p>	フィルターを包んだアルミホイルの上に純水で置換し丸めたアルミホイルを入れ、フィルターを完全に沈める。
	3	<p>エクストルーダーの部品(ゴムパッキン、ホース、鉄のフィルター)は純水を入れた200mlビーカーに入れ、固定用のねじはアルミホイルで包む。</p>	
	4	<p>オートクレーブバックを純水で置換する。金属とその他に分けてバックに入れ、口をしぼる。</p>	
	5	<p>パスツール、遠心用チューブはそれぞれ金属容器に入れる。</p>	
10:30	6	<p>オートクレーブ内部のかごにそれぞれのオートクレーブバックを入れ、スイッチを入れる(121℃、20分)。</p>	

工程 No. 1-2	工程	混合脂質の作製
------------	----	---------

1.概要

使用機器をオートクレーブにかけ、滅菌する。

2.原料

原料	量	入手先
DPPC	150 mg	日本精化
Cholesterol	78.88 mg	日本精化
DHSG	28.37 mg	日本精化
PEG-DSPE	7.752 mg	日油
H12-PEG-Glu2C18	7.044 mg	工程 No. 1-1 にて合成
t-BuOH		

3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
電子天秤	1	XS205	メラー・トレド株式会社
薬さじ	1		
薬包紙	5	2022	HAKUAI
ナスフラスコ	1		
パスツールピペット	1	1K-PAS-9P	IWAKI
スポイト	1		
恒温槽	1		
凍結乾燥機	1	DC400	ヤマト科学株式会社