

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：糖鎖認識多階層ナノDDS創成に関する研究

Development of multi-step targeted nano DDS utilizing sugar chain recognition systems

研究開発実施期間：2017年5月1日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：山下 富義

YAMASHIYA, FUMIYOSHI

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人京都大学 大学院薬学研究科 教授

Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

II 研究開発の概要

【研究背景および目的】

受容体や酵素といった創薬標的がもはや枯渇し、近年の創薬研究は、細胞内タンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) の調節など開発障壁の高い未踏領域に突入している。PPIは、タンパク質間の厳密な認識に基づく膨大な組み合わせであり、創薬標的として大きな可能性を秘めている。しかし、その広い相互作用面に薬剤が作用して機能を調節するためには、抗体やアプタマー等の高分子や中分子化合物の利用が不可欠となる。これを成功に導くためには、これら高分子量の治療薬を如何にして膜透過させ、細胞内の標的へ送り届けるかが重要な鍵となる。

糖鎖は、外来異物の認識や細胞間コミュニケーションを担うほか、糖タンパク質・糖脂質の細胞内運命の調節も担っている。当研究グループはこれまでに糖鎖認識に基づくドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発研究に取り組み、特定の細胞への薬物ターゲティングにも成功してきた。本研究では、投与部位から標的分子までをトータルシステムと捉え、糖鎖認識を基盤に中分子・高分子物質をデリバリーする技術開発研究に着手した。標的指向化糖鎖リガンドとして、炎症血管に高発現するE-セレクトインを標的としたシアリルルイスXの構造単純化体 (sLeX ミミック)、がん細胞に発現するCD44受容体に結合するヒアルロン酸の2種類を選択して検討を行った。一方、薬物を担持するナノキャリアとしてリポソーム、ポリマーミセル、ポリマーソームの3種類を調製し、これらを組み合わせて物性、細胞内動態、体内動態の各側面から多角的な評価を行った。

【研究成果】

1. 糖鎖修飾標的指向化ナノキャリアの調製と細胞内動態

標的指向化リポソームの調製にあたって薄膜水和法とエタノール注入法のいずれを用いても、粒子径、ゼータ電位に製法間の違いはみられなかった。粒子径は約110nmであり、3'-(1-carboxy)ethyl sLeX mimic (3'-CE

sLeX mimic) で修飾することによりゼータ電位が負になった。mTOR 阻害薬エベロリムスを封入した sLeX mimic 修飾リポソームを調製し、TNF- α と IL-1 β で処置した HUVEC 細胞を用いて *in vitro* 実験を行った。創傷治癒アッセイにおいて、エベロリムスを sLeX ミミック修飾リポソームに封入したほうが PEG 修飾リポソームの場合に比べ顕著な細胞遊走阻害効果が認められた。3D マトリゲルでの HUVEC のチューブ形成の阻害に対しても sLeX mimic 修飾リポソームが効果的であった。これらはエベロリムスの HUVEC への取り込みが sLeX mimic 修飾リポソームによって促進されるという結果とも対応した。しかし、sLeX mimic 修飾によるエベロリムスの取り込み促進効果は、蛍光マーカーでの評価結果に比べると限定的であり、リポソームからのエベロリムスの放出が示唆された。

水溶性のペプチドやタンパク質のナノキャリアとして、ポリエチレングリコール-ポリカプロラクトン (mPEG-PCL) ブロック共重合体からなるポリマーソームを調製した。がん細胞への標的指向性を付与するために、ポリマーソーム外膜の mPEG-PCL を NH₂-PEG-PCL で一部置換し、ヒアルロン酸を縮合させた。CD44 を高発現する HeLa 細胞に対して、バシトラシン封入ヒアルロン酸修飾ポリマーソーム作用させたところ、顕著な細胞毒性が観察された。バシトラシンは、水溶性で分子量が大きいためほとんど細胞内に取り込まれない。本結果は、ヒアルロン酸修飾ポリマーソームによってバシトラシンの内在化が促進された結果、小胞体内に存在するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが阻害されたことを示している。また、KDEL 配列を C 末端に持つ蛍光標識ペプチド (FITC-(GGGS)₂-KDEL) を合成し、ヒアルロン酸修飾ポリマーソーム封入体の HeLa 細胞における細胞内蛍光分布を観察した。C 末端が KDEA 配列の場合とは異なって、KDEL ペプチドの場合には ER 染色蛍光試薬との強い共局在がみられ、小胞体への分布が観察された。内封ペプチドに対して標的指向性を付与することによって多段階での薬物送達が可能であることが示された。

2. sLeX ミミック修飾リポソーム製剤の体内動態と治療効果

3'-CE sLeX mimic 修飾リポソームおよび未修飾リポソームを [¹⁴C]オレイン酸コレステロールで放射標識し、マウス尾静脈内投与後の体内動態を評価した。3'-CE sLeX mimic 修飾リポソームでは、PEG 修飾リポソームに比べて脾臓や肝臓への集積性が若干高いものの、血中からの消失は同程度であった。がん組織への集積に関しては、PEG 修飾リポソームが徐々にがん組織に蓄積したのに対し、3'-CE sLeX mimic 修飾リポソームでは速やかに定常状態に到達する傾向があった。 [³H]エベロリムスはリポソームに封入してもエベロリムス単独と同じ体内挙動を示し、エベロリムスが血中で速やかに放出されることが示唆された。一方、 [³H]ドキシソルビシンの場合は、 [¹⁴C]オレイン酸コレステロールの場合と同じ挙動を示し、ドキシソルビシンは 3'-CE sLeX mimic 修飾リポソームに安定に保持されてがん組織への移行が促進されることが示された。一方、過去の検討において、3'-sulfo sLeX mimic 修飾リポソームでは、封入されたドキシソルビシンが急速に肝臓や脾臓に蓄積することを明らかにしている。今回開発した 3'-CE sLeX mimic 修飾リポソームは、細網内皮系による貪食を免れることができるため、*in vivo* での炎症血管への標的指向化に有望であると示唆された。そこで、担がんマウスを用いてドキシソルビシン封入 3'-CE sLeX mimic 修飾リポソームの腫瘍増殖抑制効果を評価した結果、PEG 修飾リポソームと同程度の治療効果を示した。

3. sLeX ミミック修飾低分子抗体の作製と評価

ナノキャリア封入に代わる低分子抗体等タンパク質医薬品の細胞内送達法として、標的指向化素子の直接化学修飾を検討した。しかし、反応性アミノ酸への脱水縮合は非特異的に起こることが問題となるため、アジド基を有する非天然アミノ酸をクローニングにより特定の位置に挿入し、クリック反応を利用して部位特異的に sLeX mimic を導入する方法を考案した。蛍光タンパク質 mKO2 の C 末端部位にアジドフェニルアラニンを挿入し 3'-CE sLeX mimic-DBCO を結合させたところ、蛍光スペクトルに影響なく糖鎖リガンドを導入できることが確認された。さらに、3'-CE sLeX mimic 修飾 mKO2 を TNF- α と IL-1 β で処置した HUVEC 細胞に作用させると顕著な取り込みが観察された。さらに、小胞体指向性の KDEL ペプチドを結合した mKO2 に 3'-CE sLeX mimic を修飾した場合には、mKO2 と ER 染色蛍光試薬の分布が一致し、小胞体への局所的な送

達も可能であることが示された。mKO2 の場合と同じ方法で、抗 MDM2-scFv の抗原認識部位から離れた箇所にアジド基を導入し、sLeX mimic-DBCO を結合させた。Fluoppi システムを用いて p53-MDM2 結合の解離の効果を評価したところ、sLeX mimic-scFv の添加で蛍光輝点の消失が確認された。さらに、HUVEC 細胞のチューブ形成を評価したところ、sLeX mimic-scFv はこれを有意に阻害できることが示された。

4. 糖鎖リガンドの設計および合成

市販のラクトースを出発原料として7段階の反応を経て、アグリコン末端にトリフルオロアセトアミド基を有する二糖アクセプターを大量合成した。さらに、溶媒効果を利用したフコース供与体との立体選択的グリコシル化反応を行った後、さらに3段階を経て sLeX mimic 合成のための共通ユニットを合成した。目的とする 3'-CE sLeX mimic 体への誘導は、3位選択的カルボキシメチル化、全保護基の除去、選択的アミド化反応による DSPE-PEG および環状オクチン含有置換基の導入を経て行った。この際、3位選択的カルボキシメチル化反応の収率向上も検討し、カルボキシメチル化剤の脱離基を臭素からトリフルオロメタンスルホン基に変更することで、飛躍的に導入率を改善できた。

細胞内取り込みおよび細胞内小器官への標的指向化素子として利用するため、N-グリカン M5 の構造単純化糖の設計および多量合成を目的に、五糖、四糖、三糖ユニットを合成した。枝分かれ五糖の分岐点となるマンノースユニット、分岐三糖ユニット、マンノース単糖ユニットの合成を完了し、逐次、糖鎖伸長を行うことにより、五糖、四糖、三糖ユニットの糖鎖骨格を構築した。その後、完全脱保護反応を経て、アグリコン末端にアミノ基を有するミミック候補分子の合成に成功した。

【今後の課題と方向性】

本研究において、3'-CE sLeX mimic 修飾ナノキャリアは、E-セレクトインを介して効率よく炎症血管に取り込まれること、過去に開発した 3'-sulfo sLeX mimic 体とは異なって血中滞留型 PEG 修飾リポソームにも匹敵する高いステルス性を有していることが明らかとなった。ドキシソルビシン封入りリポソーム製剤の抗腫瘍実験において 3'-CE sLeX mimic 修飾体の効果は PEG 修飾体と同程度であったが、皮下移植モデル動物では EPR 効果が顕著に表れるため差別化が難しかったのかもしれない。今回の研究では、オンチップ血管構築型がん組織スフェロイドにおいて 3'-CE sLeX mimic 修飾体のほうが高い組織移行性を示すことも明らかにしている。血管形成阻害による抗腫瘍効果が見やすい自然発症モデル等を使って同様の検討を行う必要がある。今回の検討では、エベロリムスのように一部の薬物では薬物保持の安定性が問題となった。薬物によっては共有結合を使った高分子プロドラッグ化も必要と考えられる。一方、低分子抗体等タンパク質に対しては、標的指向化リガンドの直接化学修飾法が多階層的薬物送達に有効な手段となることが示された。今後、細胞内挙動のメカニズム解析を含め、応用事例を重ねながら本アプローチの有効性を証明することが必要である。

[Research background and objectives]

Recently, protein-protein interactions have increasingly been explored as potential drug targets. Utilization of macromolecules such as antibodies and aptamers and mid-size drugs is required to regulate the interactions, but hampered by low membrane permeability. In this study, we have challenged targeted delivery of such drugs by the use of sugar-chain recognition systems, considering the processes from the administration site to the target site as a total. We mainly focused on the two types of ligands; i.e., structurally simplified sialyl Lewis X (sLeX) mimics targeted to E-selectin, which is highly expressed in inflammatory blood vessels, and hyaluronic acid targeted to CD44 receptors expressed in cancer cells.

[Results]

1. Preparation and intracellular dynamics of glycosylated target-directed nanocarriers

Liposomes bearing 3'-(1-carboxy)ethyl sLeX mimic (3'-CE sLeX mimic) were negatively charged and sized about 110nm. When an mTOR inhibitor everolimus was incorporated, 3'-CE sLeX mimic liposomes showed stronger anti-angiogenic effect in inflamed HUVEC cells than PEG-modified liposomes. It is due to enhanced cellular uptake by 3'-CE sLeX mimic modification, but not as effective as expected from the result of the fluorescent marker uptake, suggesting the partial release of everolimus from liposomes.

mPEG-PCL polymersomes were prepared for the delivery of water-soluble mid-size drugs. When encapsulated in the hyaluronic acid-modified polymersomes, bacitracin exhibited strong cytotoxicity against HeLa cells, suggesting enhanced internalization and delivery to endoplasmic reticulum (ER). On the other hand, a KDEL peptide encapsulated in the polymersomes was more greatly localized in ER than the control KDEA peptide. Thus, multi-step drug delivery can be achieved by adding target-directedness to the encapsulated drugs.

2. Pharmacokinetics and therapeutic effects of sLeX mimic-modified liposome formulations

Plasma clearance and tissue distribution of 3'-CE sLeX mimic-modified liposomes was comparable with PEG-modified liposomes. Comparison between 3'-CE sLeX mimic- and 3'-sulfo sLeX mimic-modified liposomes indicates that the 3'-CE sLeX mimic-modified liposomes are promising for target-directed targeting to tumor tissues. Doxorubicin-encapsulated 3'-CE sLeX mimic-modified liposomes showed comparable anti-tumor activity to the case of PEG-modified liposomes in tumor-bearing mice.

3. Design, preparation, and evaluation of sLeX mimic-modified small molecule antibodies

Direct chemical modification of protein drugs such as low-molecular-weight antibodies is an alternative to encapsulation in targeted nanocarriers. Non-natural amino acids containing azide groups are inserted into the protein sequence to introduce the sLeX mimic ligand in a site-specific manner. For 3'-CE sLeX mimic-conjugated mKO2, a pronounced uptake was observed in inflamed HUVEC cells. The same way as for mKO2 was applied to anti-MDM2-scFv. Incubation of HUVEC cells with sLeX mimic-scFv resulted in the loss of fluorescence bright spots in the Fluoppi system. The tube formation of cytokine-stimulated HUVEC cells was also significantly inhibited by sLeX mimic-scFv.

4. Design and synthesis of glycan ligands

Using commercially available lactose as a starting material, a large amount of disaccharide acceptor with a trifluoroacetamide group was synthesized and subjected to a stereoselective glycosylation reaction with a fucose donor. The induction to the desired 3'-CE sLeX mimic form was achieved by 3-position selective carboxymethylation, removal of protective groups, selective amidation of DSPE-PEG and cyclic octin-containing substituents. The yield of the 3-position selective carboxymethylation reaction was greatly improved by changing the leaving group of the carboxymethylating agent from bromine to trifluoromethanesulfonyl groups. Structurally simplified N-glycan M5 was designed and developed for enhanced intracellular uptake and targeted delivery to organelles.

[Future challenges and directions]

The present study demonstrated that the 3'-CE sLeX mimic-modified nanocarriers show E-selectin-mediated efficient uptake in inflammatory vessels and much better in vivo disposition characteristics as compared to 3'-sulfo sLeX mimic ones. To demonstrate the superiority against PEG-liposomes, anti-tumor activity should be measured in autochthonous tumor models. In addition, modification of target-directed ligands to small-molecule antibodies is likely effective for multi-step drug delivery. Effectiveness of the approaches should be confirmed through a series of applications, including mechanism analysis of intracellular behaviors.