

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：高分子医薬品の経口投与を可能とする小腸透過環状ペプチドキャリアの開発
Novel cyclic peptide carrier enabling oral administration of macromolecular drugs.

研究開発実施期間：平成 29 年 5 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：大槻 純男
OHTSUKI, Sumio

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 教授
Kumamoto University, Faculty of Life Sciences, Professor

II 研究開発の概要

近年、ペプチド製剤やタンパク質製剤等の高分子医薬品の開発が盛んに行われている。しかし、高分子医薬品は、小腸において吸収されなく、経口投与が選択できないことが大きな課題である。小腸透過キャリアは高分子医薬品の経口投与の実現に必要なドラッグデリバリー技術である。研究代表者らは、*in vivo* で小腸透過能を有する事を明らかにした新規環状ペプチドを同定している。そこで、本研究では、新規同定した小腸透過環状ペプチドを基盤として高分子医薬品の経口投与を可能とする環状ペプチドキャリアを開発することを目的とする。さらに、新規環状ペプチドの脳関門透過ペプチドキャリアとしての性能を評価することも目的とする。

この目的達成のため、本研究開発では、独自開発を行った小腸透過環状ペプチドのキャリアとしての安定性向上や高分子医薬品経口投与を目指し、D-アミノ酸化環状ペプチドの検討、インスリン等の小腸透過と経口投与技術の開発、透過の分子メカニズム解明、及び脳関門透過能を *in vitro* と *in vivo* レベルで明らかにする事を目的とした。

1) D 体化および環状化による小腸透過環状ペプチドの小腸透過能の検証

蛍光(FAM)標識した L 体及び D 体アミノ酸から構成される小腸透過環状ペプチド、およびジスルフィド結合をしていない直鎖状の L 体及び D 体アミノ酸から構成される同一配列の小腸透過環状ペプチドを合成し、*in vitro* ヒト小腸モデル細胞である Caco-2 細胞 transwell 透過アッセイ系を用いて合成環状ペプチドの透過活性を評価した。その結果、L 体及び D 体小腸透過環状ペプチドは Caco-2 細胞を透過したが、直鎖状ペプチドは FAM 単体と差がなく有意な透過は検出できなかった。また、環状 L 体小腸透過ペプチドの Caco-2 細胞透過速度は D 体ペプチドよりも速かった。従って、小腸透過能は L 体から構成させる小腸透過ペプチドの方が高いこと、小腸透過環状ペプチドの小腸透過には環状化が必須であることが示唆された。

次に *in vivo* における FAM 標識 L 体及び D 体小腸透過環状ペプチドの小腸透過能をマウス小腸 *in situ* closed loop 法によって評価した。その結果、小腸に投与した FAM 標識 L 体及び D 体小腸透過環状ペプチドは投与 10 分後に門脈血中から検出され、環状 L 体小腸透過ペプチドの血中濃度は D 体と比較して高かった。また、顕微鏡観察の結果、小腸上皮において透過過程にある蛍光が観察された。以上の結果から、L 体および D 体の小腸透過環状ペプチドはともに小腸上皮細胞透過能を有することが明らかとなった。

2) 小腸透過環状ペプチドの小腸透過に関わる分子機構の解析

小腸透過環状ペプチドを提示するファージの Caco-2 細胞への取り込み特性と各種阻害効果を検討した結果、L 体小腸透過環状ペプチドを認識する飽和性輸送機構が関与するマクロピノサイトーシスが透過の取り込み過程に関わっていることが示唆された。また、小腸透過環状ペプチドのアミノ酸配列は、ある種の細菌や原虫の細胞表面に発現しているタンパク質の一部と一致した。このタンパク質は、リガンドタンパク質を介して特定の分子 X に結合することが報告されている。そこで、分子 X の特定の subtype の関与を小腸透過環状ペプチドとインスリンの共投与による血糖降下作用によって評価した。小腸透過環状ペプチドとインスリンとともに分子 X の特定の subtype に対する中和抗体を共投与した結果、血糖値降下作用が消失した。従って、小腸透過環状ペプチドの小腸透過に分子 X の特定の subtype が関与していることが明らかとなった。また、さらなる詳細な分子機構解析のため内在化タンパク質の網羅的解析を可能とする新しいプロテオーム解析技術を構築した。

小腸透過環状ペプチドの小腸透過過程にマクロピノサイトーシスが関わっていることから、マクロピノサイトーシスの誘導による非特異的な輸送の促進の可能性について評価した。蛍光デキストランと小腸透過環状ペプチドを同時に Caco-2 細胞に添加し、細胞内への取り込みを評価した。その結果、蛍光デキストランの細胞内取り込みは促進されなかった。また、蛍光化合物 FAM についても小腸透過環状ペプチドと共添加では Caco-2 細胞への取り込みは促進されなかった。一方、FAM と小腸透過環状ペプチドを結合させることによって FAM の Caco-2 細胞への取り込みは促進された。従って、小腸透過環状ペプチドは非特異的に周囲の物質の取り込みを促進するのではなく、結合等によって小腸透過環状ペプチドと相互作用している物質の取り込みを促進することが明らかとなった。

3) 小腸透過環状ペプチドによる高分子小腸透過の解析

安全性に関する評価の一環として L 体及び D 体小腸透過環状ペプチド投与による小腸上皮細胞の障害を乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出によって評価した結果、小腸透過ペプチドの小腸投与 2 時間後において、小腸からの LDH 漏出は検出されなかった。従って、L 体及び D 体小腸透過環状ペプチドは小腸障害を惹起しないことが明らかとなった。また、同時に血液生化学検査を実施した結果、検討した 18 項目について有意な変化は認められなかった。以上の結果から、単回投与を想定した短時間において、小腸透過環状ペプチドは小腸および各種臓器に対する障害は小さいことが明らかとなった。

汎用性の高さおよび評価の明確性から小腸透過環状ペプチドとインスリンの共投与による血糖降下作用を検討した。L 体及び D 体アミノ酸から構成される小腸透過環状ペプチド、およびジスルフィド結合をさせていない直鎖状の L 体及び D 体アミノ酸から構成される同一配列のペプチドとヒトインスリンを小腸に共投与を行った。その結果、インスリン単独では血糖降下作用が認められなかったが、L 体及び D 体小腸透過環状ペプチドとの共投与では血糖降下が認められた。一方で直鎖状 L 体および D 体ペプチドとの共投与では血糖降下作用は認められなかった。従って、インスリンとの共投与による血糖降下作用にはペプチドの環状化が必要であることが明らかとなった。また、L 体と比較し D 体小腸透過環状ペプチドの方が共投与による血糖降下作用が強かった。さらに、小腸を透過したヒトインスリンが血中

に移行している事を確認するために、ELISA により血中濃度を測定した。共投与後 10 分において小腸に投与したヒトインスリンが門脈血中から検出された。小腸透過環状ペプチドとインスリンの相互作用を NanoITC によって測定した結果、弱い相互作用が検出された。従って、小腸透過環状ペプチドとインスリンは腸管内で相互作用することでインスリンは小腸上皮細胞を透過し、血中に移行したインスリンが血糖降下作用を発揮していることが示唆された。また、インスリン透過活性は D 体小腸透過環状ペプチドの方が強いことが明らかとなった。

次に、小腸透過環状ペプチドとインスリンの経口からの共投与による血糖降下作用を検討した。インスリン単独投与では経口投与のショックによる一時的な血糖値上昇が認められるが、L 体及び D 体小腸透過環状ペプチドとの共投与によってその上昇は抑制された。特に D 体小腸透過環状ペプチドとの共投与で上昇は完全に抑制された。従って、小腸透過環状ペプチドはインスリン経口投与のための添加剤としての可能性を有していることが明らかとなった。

さらなる血糖降下作用増強を目指し、検討した結果、Y の添加が有効であることが明らかとなった。Y 添加により D 体小腸透過環状ペプチドの小腸内への共投与による血糖降下作用が大幅に増強された。また、門脈血中に投与したヒトインスリンが検出された。経口からの共投与においても Y の添加によってインスリンと小腸透過環状ペプチドの共投与は投与ショックによる血糖値上昇が抑えられるだけでなく、有意な血糖降下作用が検出された。

4) 環状ペプチドの脳関門透過能の検討

小腸透過環状ペプチドの脳関門透過能を検討するためにヒト脳関門モデル細胞である hCMEC/D3 細胞への取り込みを評価した。その結果、小腸透過環状ペプチドはヒト脳関門モデル細胞へ取り込まれなかった。従って、小腸透過環状ペプチドは脳関門透過能を有さないことが強く示唆された。そこで、ヒト脳関門モデル細胞透過系と環状ペプチドを提示するファージディスプレイを用いて脳関門透過環状ペプチドを新に同定した。本環状ペプチドはラット及びサルの脳関門モデル細胞のファージ透過を促進することが明らかになった。また、脳関門透過環状ペプチドを提示するファージを静注し、60 分後にファージが脳内に移行していることが検出された。加えて、リポソームを脳関門透過環状ペプチドで修飾することによって、リポソームの脳への分布が促進することが示された。

研究計画項目として設定した 1) D 体ペプチド、2) 分子機構、3) 高分子（インスリン共投与）4) 脳関門透過の各項目に関しては当初目標及び目標以上の内容を達成し、取り込み段階に関わる分子を明らかにし、D 体小腸透過環状ペプチドが小腸透過促進添加キャリアとして有効であること、そして、新規の脳関門透過環状ペプチドがリポソームの脳送達を可能とする DDS キャリアであることを明らかにした。これらの成果の一部は J Control Release に 2 報を発表している。インスリンの経口投与化については小腸透過環状ペプチドの添加だけではなく新たな添加化合物を用いることによって大幅な透過効率の上昇を実現した。また、脳関門透過に関してはこれまで困難であったリポソームの脳関門透過を実現した。リポソームに高分子を含む医薬品を内封することによって汎用性の高い脳への送達技術へと発展することが期待できる。

In recent years, development of macro- and middle-molecular drugs has been actively conducted. However, macro- and middle-molecular drugs are not absorbed in the small intestine, and it is a major problem that oral administration is unable to be selected for administration route for macro- and middle-molecular drugs. Small intestinal permeation carrier is a drug delivery technique indispensable for oral administration of macro- and middle-molecular drugs. We have identified a novel cyclic peptide which have ability to permeate across small intestine *in vivo*. Therefore, in this project, we aim to develop a cyclic peptide carrier that enables oral administration of macro- and middle-molecular drugs based on newly identified intestinal permeable cyclic peptides. It is also an objective to identify and evaluate the performance of a novel cyclic peptide as a brain barrier penetrating peptide carrier.

We have evaluated effects of D-amino acids and cyclization on the intestinal permeability of identified peptide. We have synthesized peptide having same amino acid sequence, but ones were consistent with L-amino acids and others were with D-amino acids, and ones were cyclized but others were linearized. The permeability performance was examined by *in vitro* transcellular permeability assays with Caco-2 cell monolayer and mouse *in situ* closed loop intestinal permeability assay. As a result, both L-form and D-form cyclic peptide exhibited the permeation across the intestinal epithelial cells, but linear peptide did not. This indicates that cyclization is necessary for the permeation, and both L-form and D-form has the ability of intestinal permeation.

To analyze the molecular mechanisms involved in the intestinal permeation of the cyclic peptide, the candidate molecule X was identified based on sequence similarity. The neutralizing antibody against molecule X suppressed the decrease of blood glucose levels by co-administration of intestinal permeable cyclic peptide and insulin. This result suggests that molecule X is involved in the permeation process of cyclic peptide. The micropinocytosis is suggested to play a role in the internalization process of cyclic peptide into intestinal epithelial cells. It proposes the possibility that the cyclic peptide facilitates unspecific internalization by induction of micropinocytosis. However, the cyclic peptides did not facilitate internalization of either FITC-dextran or FAM in Caco-2 cells by co-treatment.

We also evaluated the application of the cyclic peptide to the intestinal absorption of insulin by co-administration. Co-administration of D-form cyclic peptide enhanced the effect of blood glucose lowering effect by insulin compared with L-form cyclic peptide. Nano-ITC analysis detected the interaction between the cyclic peptide and insulin. The administered human insulin was detected in portal vein blood by ELISA. we also found an additive compound that enhance the blood glucose lowering effect by co-administration of the cyclic peptide and insulin. Co-administration could also decrease blood glucose levels by oral administration. The blood lowering effect by co-administration with insulin was greater by the D-form cyclic peptide than by the L-form peptide.

The intestinal permeable cyclic peptide was not taken up in the human BBB model cells. Therefore, we have identified by cyclic peptide that facilitate the permeation across the BBB. The identified cyclic peptide facilitated the BBB permeation *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the liposome modified with the cyclic peptide was distributed into the brain after *iv* administration.

The present project has developed that new technology to enhance the intestinal permeability of insulin by co-administration of D-form cyclic peptide and additives. This can be applied to other peptide-based drugs. In addition, we have identified the new cyclic peptide facilitating BBB permeability. The liposomes modified with this peptide can be a nano-capsule to deliver drugs to the brain.