

博士論文

NSAIDs の脳移行性を指向したイオン液体
含有経鼻投与製剤の開発に関する研究

日本大学大学院薬学研究科薬学専攻

谷川 寛明

2024

目次

第1章 緒論.....	1
第2章 NSAIDs含有ILのスクリーニングと物理化学的特性の評価.....	5
2-1 序論.....	6
2-2 実験方法.....	8
2-3 結果・考察.....	11
2-4 小括.....	23
第3章 ETD含有IL経鼻投与後の鼻腔内滞留性および脳移行性の評価.....	24
3-1 序論.....	25
3-2 実験方法.....	27
3-3 結果・考察.....	29
3-4 小括.....	37
第4章 総括.....	38
引用文献.....	40
謝辞.....	53

略語一覽

API:	active pharmaceutical ingredient
BBB:	blood brain barrier
BCS:	biopharmaceutics classification system
COX:	cyclooxygenase
DDS:	drug delivery system
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DSC:	differential scanning calorimetry
ETD:	etodolac
HEPES:	4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
¹ H-NMR:	proton nuclear magnetic resonance
HPLC:	high performance liquid chromatography
IL:	ionic liquids
IMC:	indomethacin
IR:	infrared spectroscopy
KPF:	ketoprofen
LPS:	lipopolysaccharide
MCC:	mucociliary clearance
MLX:	meloxicam
NSAIDs:	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PBS:	phosphate-buffered saline
PG:	prostaglandin
ProOEt:	proline ethyl ester
PRX:	piroxicam
PXRD:	powder X-ray diffraction

第 1 章

緒論

超高齢化社会下の本国では、難治性の中枢神経系疾患に罹患する患者数は増加傾向にある[1] [2]。難治性中枢神経系疾患の多くは、脳内で生じる炎症反応が発症要因の1つであると考えられており[3] [4]、アルツハイマー病や脳梗塞発症時の脳内において、炎症性物質であるプロスタグランジン (prostaglandin: PG) E₂やそれを合成する酵素であるシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) -II タンパクの増加が報告されている[5] [6]。そのため、炎症反応を抑制する非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) が中枢神経系疾患の治療薬として報告されている[7] [8]。実際に、NSAIDsであるメフェナム酸やインドメタシンの脳室内への投与は、脳梗塞における梗塞体積を約 80%抑制すること[7]、アルツハイマー病ではその病態に深く関与するアミロイドβタンパク質に対するミクログリア/マクロファージの反応性が低下することがそれぞれ報告されている[8]。しかしながら、脳室内投与は侵襲性が高く、患者への負担が大きいことから、疾患とは異なる有害事象の発生が懸念される。また、経口投与あるいは静脈投与などの従来法で投与された NSAIDs の脳移行性は、脳毛細血管内皮細胞より構成される血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) により厳格に制限されている[9]。BBB を突破あるいは回避し、NSAIDs のような BBB 非透過性薬物を脳へ送達する技術の開発は喫緊の課題であるため、様々な送達技術が検討されている。Yue らは、グルコーストランスポーター (GLUT1) やナトリウム依存性ビタミン C トランスポーターの基質であるグルコースやビタミン C とイブプロフェンを同時に投与しトランスポーターを介することで BBB を突破し、イブプロフェンを脳内へ送達した[10]。また、中枢移行性を改善することを目的に、エタノールアミン構造を導入することでプロドラッグ化したデキシブプロフェンや、BBB 上のペプチド受容体を介したトランスサイトシスを利用するためペプチドを結合したフルルビプロフェンなどが脳内に送達されている[11] [12]。しかしながら、プロドラッグ化や受容体基質の修飾はトランスポーターの種類により厳格な立体化学的要件が求められることにより[13]、トランスポーターと基質間の相互作用を調節する分子メカニズムの解明が事前に必須となる[14]。これら送達技術による医薬品の開発には時間を要することから、より簡便な送達技術の創出が求められている。

近年、BBB 非透過性薬物を脳へ直接送達することのできる投与方法として、BBB を迂回し脳への直接経路 (Nose-to-Brain 経路) の存在が報告される経鼻投与が注目を集めている[15] [16] [17]。鼻腔内に投与された医薬品は、嗅粘膜に存在する嗅神経あるいは

呼吸粘膜に存在する三叉神経の神経周囲腔や血管周囲腔を満たす間質液を介し、脳実質や脳脊髄液を介して脳へ送達される (Fig. 1) [18] [19] [20]. これまでに、げっ歯類[21] およびヒトを含む霊長類[22] [23]において、BBB の透過が困難な医薬品が経鼻投与後に鼻から脳へ移行することが多数報告されている。また、経鼻投与には、肝臓における初回通過効果の回避、全身性副作用の発現リスクを低下させることに加えて、投与が簡便で自己投与が可能なことから、患者アドヒアランスの向上などの多数の利点がある。しかしながら、鼻腔表面には、経鼻投与された薬物を咽頭側へ排泄する生体防御機構の粘液繊毛クリアランス (mucociliary clearance: MCC) が存在する[24]. そのため、鼻腔表面における薬物滞留時間が短縮され、鼻粘膜からの薬物吸収量が減少することで薬物のバイオアベイラビリティが低下する[25]. また、鼻粘膜組織には嗅粘膜や呼吸粘膜などのタイトジャンクションにより形成される粘膜バリアが存在する[26]. そのため、Nose-to-Brain 経路を利用した脳標的経鼻投与製剤の設計では、薬物の鼻粘膜表面における滞留性の改善ならびに鼻粘膜透過性の付与が必要となる[27]. これらを達成する製剤設計戦略として、粘膜付着剤や吸収促進剤などの添加が挙げられる[28] [29]. 具体的には、経鼻投与デバイスによる噴霧時には溶液状態で鼻粘膜付着後にゲル化することで高い鼻腔内滞留性を付与する *in-situ* ゲル製剤や粘膜透過性や組織移行性の優れる脂質ナノキャリア、ならびにこれらを併用した経鼻投与製剤の設計が報告されている[30] [31]. しかしながら、ヒトの鼻腔は複雑な構造であり鼻腔内容積が非常に小さいため[32], 鼻腔に経鼻投与できる製剤量は、液体製剤では 25~200 μL [33], 粉末製剤では最大で 1 回の噴霧当たり 10~25 mg[34]と、経口投与や注射薬などの投与方法と比較して少量であり、特に、Nose-to-Brain 経路を介した薬物送達への寄与が大きいと考えられる嗅粘膜に到達する製剤量は投与量に対して数%であるといわれている[35]. そのため、これら *in-situ* ゲル製剤や脂質系ナノキャリアに用いる添加剤の多用は、製剤の薬物含有量を減量し、嗅粘膜ひいては脳への薬物到達量を低下させることが懸念される。したがって、脳標的経鼻投与製剤の開発では、様々な製剤特性を併せ持つ製剤材料が有用であると考えられる。

イオン液体 (ionic liquids: IL) は、アニオンとカチオンがイオン性相互作用を介して形成する液状有機塩の総称であり、近年、製剤材料として注目されている。薬物を構成成分とする IL を設計することで、その薬物の溶解性、粘稠性および熱安定性などの物理化学的特性の付与や[36] [37], IL を経皮吸収型製剤とすることで薬物の皮膚透過性を

改善することが報告されている[38][39][40]. これら IL の特徴から, IL を経鼻投与製剤に適用した場合, 他の添加剤を用いることなく製剤に鼻腔内滞留性や鼻粘膜透過性を付与し, Nose-to-Brain 経路による薬物の効率的な脳送達を達成することが期待できる. しかしながら, これまでに IL を経鼻投与製剤に適用した報告はほとんどなく, IL が経鼻投与した薬物の鼻腔内滞留性や脳移行性に及ぼす影響はこれまでに明らかとなっていない.

本研究では, BBB 非透過性であることが知られている NSAIDs の経鼻投与による脳への送達に IL を適用することの有用性を明らかにすることを目的とした. 第2章では, NSAIDs と既報のカウンターイオンであるプロリンエチルエステル (proline ethyl ester: ProOEt) を用いた新規 IL の調製を試み, その形成可否の判断および NSAIDs の IL 化が疑似鼻粘液に対する溶解性に及ぼす影響を評価した. 第3章では, 第2章で見出した IL のうち, COX-2 選択性を有するエトドラク (etodolac: ETD) からなる IL について, マウスへの経鼻投与後の脳移行性ならびに脳内炎症モデルマウスへの経鼻投与後における抗炎症効果を評価することで, IL の脳標的経鼻投与製剤としての有用性について考察した.

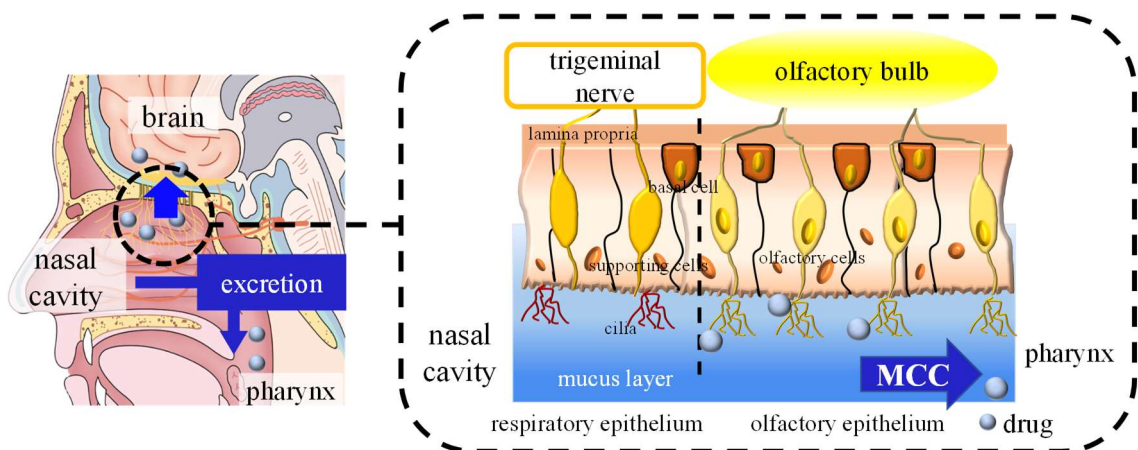


Fig.1 Schematic diagram of nose-to-brain delivery

第 2 章

NSAIDs 含有 IL のスクリーニングと 物理化学的特性の評価

2-1 序論

近年開発される薬物の多くは難水溶性であり、医薬品有効成分（active pharmaceutical ingredient: API）の 40~50%あるいは新規化合物の約 90%を占めている[41]。一般に、経鼻投与された薬物は鼻粘液中に溶解した後に鼻粘膜から速やかに吸収されるのに対して、鼻粘液中に溶けにくい薬物は鼻粘膜から吸収されることなく、MCC により鼻粘液とともに咽頭へ排泄される。そのため、難水溶性薬物の経鼻投与製剤の設計では、API の水に対する溶解性の改善が脳移行性の向上のために必要不可欠である。本研究において脳移行性の改善を試みる NSAIDs は難水溶性であり、溶解性や膜透過性による薬物の分類（Biopharmaceutical classification systems: BCS）においてクラス II に分類される。すなわち、優れた膜透過性を有するものの低い溶解性であることから、粘膜からの吸収性を改善するには薬物の溶解性を改善する必要がある。

難水溶性薬物の水に対する溶解性改善手法として、これまでに薬物の非晶質化や分子複合体の設計などが報告されている[42] [43] [44]。非晶質化された薬物は熱力学的に不安定であり、熱や水分の影響により元の低い溶解度をもつ結晶に戻ることが懸念される[45]。また、Khan らは、ゾルミトリプタンとニコチンアミドからなる共融混合物を調製することでゾルミトリプタンの溶解性を改善し、経鼻投与による脳移行性が改善されることを報告している[46]。しかしながら、分子複合体を適用した経鼻投与製剤に関する研究や、鼻表面での溶解性と鼻滞留性を評価した研究は極めて少ない。

そこで、私は近年ドラッグデリバリーシステム（drug delivery system: DDS）材料として IL に着目した。IL は、一般的な有機溶媒の分子溶媒と比較して独特の物理化学的特性を備えた溶媒として注目を集めている[47]。また、結晶性薬物において制御が困難な多型が認められないなど[48]の利点を持ち、元の原薬形態と比較して化学安定性、溶解性、膜透過性を向上させることが可能である[49] [50]。しかしながら、従来 IL の代表的な構成成分であるイミダゾリウムやピリジニウムなどは、毒性の高さから医薬品への応用は難しい[51]。そこで、生体適合性の高いコリンやアミノ酸を構成成分とした IL が近年報告されている。これらの IL は、従来 IL と同様に、原薬の水に対する溶解性の改善ならびに皮膚透過性の亢進など、主に経皮製剤としての有用性が報告されている[52] [53] [54]。なかでもアミノ酸エステルである ProOEt は、NSAIDs を含有する IL のカウンターイオンとして知られている。Furukawa らは、イブプロフェンと ProOEt からなる IL は、イブプロフェンの皮膚透過性を改善することに加え、組織学的研究より ProOEt

の皮膚刺激性はプロリンと同程度であることを報告している[20]. また, Świątek らは, ナプロキセンと ProOEt からなる IL において, ブタ皮膚の透過性を 2.7 倍から 3.9 倍に増加させ, その細胞毒性はナプロキセン単体と同等であるため, 生体適合性が高いことをそれぞれ報告している[55]. これら特徴を持つカウンターイオンの ProOEt を用いることにより, NSAIDs の鼻粘液に対する溶解性を改善する IL を設計することが可能である (Fig.2). そこで, 5 種類の NSAIDs と ProOEt を用いた新規 IL をスクリーニングし, その形成の判断および疑似鼻粘液に対する溶解性を評価した.

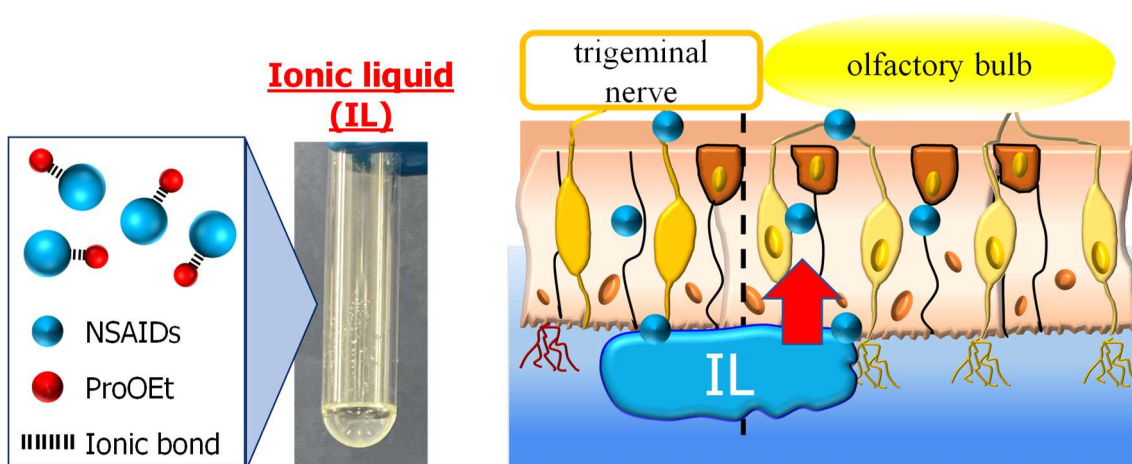
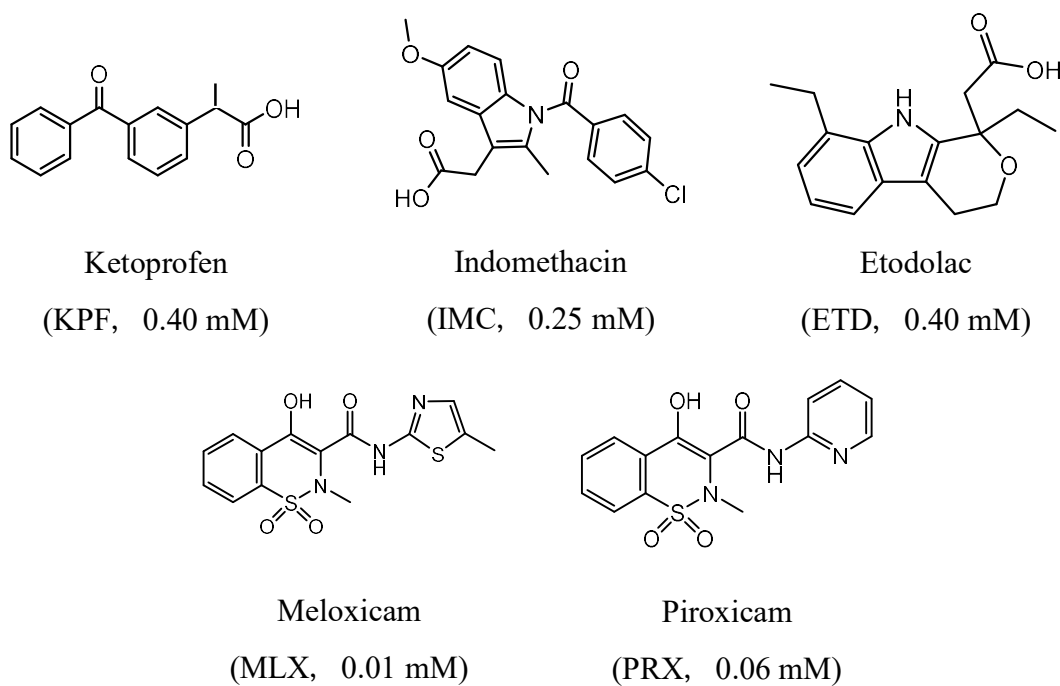


Fig. 2 Application of ionic liquid to intranasal administration.

2-2 実験方法

1. 使用試薬

ETD およびピロキシカム (piroxicam: PRX) は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した. ケトプロフェン (ketoprofen: KPF), インドメタシン (indomethacin: IMC), メロキシカム (meloxicam: MLX), L-プロリンは東京化成工業株式会社 (東京, 日本) から購入した. 他の全ての試薬は, 試薬特級グレードのものを使用した.

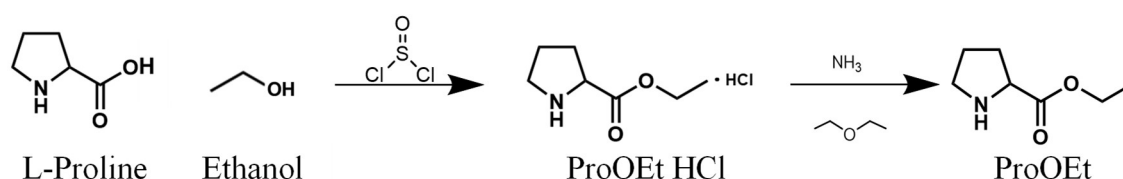


(Compound abbreviation, water solubility)

Fig. 3 Structures of NSAIDs.

2. NSAIDs 含有 IL の調製

ProOEt は scheme 1 の方法により調製した[56]. 5 種類の NSAIDs と, ProOEt をモル比, 1:1 となるようにそれぞれ 2 mL ラウンドマイクロチューブに秤量し, 温度制御型振とう機 (BSR-TMS-200, 株式会社バイオメディカルサイエンス, 東京, 日本) を用いて 40°C で 2 時間振とう混合した. 1:1 の比率において固体成分の残存が認められた組み合わせについては, 1:5 まで ProOEt の比率を増加し混合した.



Scheme 1 Preparation method of ProOEt.

3. NASIDs/ProOEt からなる液状混合物のキャラクタリゼーション

- ・粉末 X 線回折 (powder X-ray diffraction: PXRD) 測定

PXRD 測定は, Mini-Flex (株式会社リガク, 東京, 日本) を使用した. 測定は, Cu K α 放射線源を使用し, 30 kV の電圧, 15 mA の電流, 5~35° の走査角度および 4° min⁻¹ のスキャン速度にて実施した.

- ・示差走査熱量 (differential scanning calorimetry: DSC) 測定

各液状混合物の混和性を評価するため, DSC 8230 (株式会社リガク, 東京, 日本) を用いて, 液状混合物の DSC 曲線を測定した. 各試料約 3 mg をアルミニウム製のシールパンに秤量し, リファレンスとしてアルミニウムパンを同時に測定した. 測定温度は, -5°C~200°C, 昇温速度は, 5°C/min とした.

- ・赤外分光法 (infrared spectroscopy: IR)

液状混合物における分子間相互作用を評価するため, IR Spirit (島津製作所, 京都, 日本) を用いて, 液状混合物の IR スペクトルを測定した. 測定波長は 400~4000 cm⁻¹, 積算回数 16 回, ATR 法により測定した.

- ・プロトン核磁気共鳴法 (proton nuclear magnetic resonance: ¹H-NMR)

液状混合物における分子間相互作用を評価するため, JNM-ECA500 (日本電子株式会社, 東京, 日本) を用いて液状混合物の ¹H-NMR スペクトルを測定した. 試料 3 mg と内標準物質のテトラメチルシラン (tetramethyl silane: TMS) 0.05 % を重クロロホルムに

溶解して、積算回数 16 回で実施した。

4. 疑似鼻粘液に対する溶解性試験

疑似鼻粘液は、精製水に塩化ナトリウム 7.45 mg/mL, 塩化カリウム 1.29 mg/mL, 塩化カルシウム 0.32 mg/mL を溶解し 0.1 mM の塩酸を用いて pH を 5.5 に調整することで作製した[57]。34°C に加温した疑似鼻粘液に過量の NSAIDs あるいは IL を添加した後、ローテーター (RotoFlex plus, Cole-Parmer 株式会社, Illinois, USA) を用いて振とうした。規定時間後にサンプリングした溶液 50 µL を 0.45 µm メンブレンフィルターでろ過した後、ろ液を当量のメタノールで希釈した。溶解した NSAIDs の定量は、HPLC により実施した。

5 高速液体クロマトグラフ (high performance liquid chromatography: HPLC) 解析

HPLC システムは、システムコントローラー (LC-Net II/ADC), オートサンプラー (AS-2055 plus), カラムオーブン (CO-2065 plus), 紫外吸光度検出器 (UV-2075 plus), デガッサー (DG-1210) およびポンプ (PU-2080 plus) から構成されており、いずれも日本分光株式会社製 (東京, 日本) である。測定条件として、移動相は酢酸緩衝溶液 (pH 4.0) : メタノール (35:65 v/v%), カラムは Intersil ODS-3 (150×4.6 mm, 5 µm, GL sciences 株式会社, 東京, 日本), ガードカラムは InertSustain C18 (4.0×20 mm, 5 µm, GL sciences 株式会社, 東京, 日本), 測定波長は 210 nm (KPF), 254 nm (IMC) および 278 nm (ETD) とし、カラム温度は 40°C とした。

2-3 結果・考察

1. NASIDs/ProOEt からなる液状混合物のスクリーニング

最初に, ProOEt と IL を形成する NSAIDs の組合せを見出すため, 各 NSAIDs と ProOEt を様々なモル比にて混合し, 目視にて混和性を評価した. また, IL と考えられる液状混合物の得られる組合せについて, 各種装置を用いて IL の形成可否を判断した.

NSAIDs と ProOEt の各モル比における混和性を目視により観察した結果を Table 1 に示す. KPF では 1:1, IMC では 1:3, ETD では 1:2 のモル比において透明で粘稠な液体が得られた. これに対して, MLX および PRX ではいずれの比率においても混和が認められず, 固体成分の残存が認められた. これら残存物について, PXRD により結晶性を評価したところ, それぞれ MLX や PRX に由来する回折ピークが認められた (Fig. 4). PXRD 測定において, 結晶構造を有する試料ではその結晶構造に由来する回折パターン, アモルファスなどの非周期的な分子構造をもつ試料はハロパターンを示す[58]. MLX および PRX は他の 3 種類の NSAIDs と異なり, MLX はチアゾール基 ($pK_{a1}= 1.09$) とエノール性水酸基 ($pK_{a2}= 4.18$) により 2 つの pK_a 値を持ち[59], 両性イオン型, アニオン型, カチオン型および酸-エノール型の 4 種類の形態を示すことが報告されている[60]. IL はカチオンとアニオンの中和反応により形成されるため, pK_a の高いチアゾール基および上記形態の存在により, MLX および PRX の安定なアニオン型の形成に必要な ProOEt 量が増加することで本検討において実施したモル比率では液状混合物を形成せず, 薬物単体の残存が認められたと考えられる. 一方で, KPF, IMC および ETD を用いた場合に得られた液状混合物では, 各 NSAIDs の結晶成分は認められず混和性が認められたこと, 得られた液状混合物が粘稠性を示したことより, これら液状混合物中では, NASIDs と ProOEt が何らかの相互作用を介して複合体を形成している可能性が示唆された.

Table 1 Miscibility of NSAIDs and ProOEt in each molar ratio.

Molar ratio (NSAIDs: ProOEt)	KPF	IMC	ETD	MLX	PRX
1:1	○	×	×	×	×
1:2	—	×	○	×	×
1:3	—	○	—	×	×
1:4	—	—	—	×	×
1:5	—	—	—	×	×

○: 混和した ×: 結晶成分が残存 —: 未実施

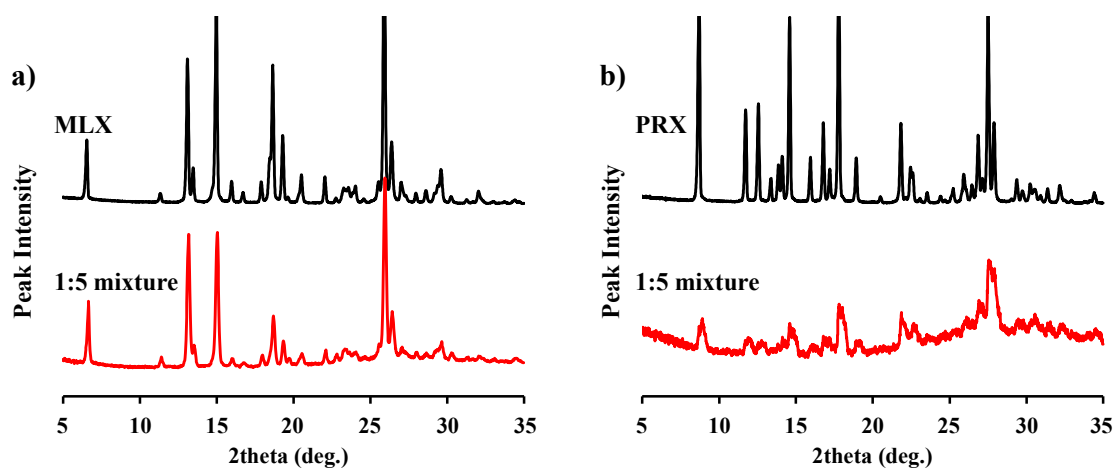


Fig. 4 PXRD patterns of each NSAIDs alone and mixtures with ProOEt, a) MLX and b) PRX.

2. KPF, IMC および ETD からなる液状混合物のキャラクタリゼーション

2.1 KPF/ProOEt 1:1 混合物

スクリーニングにおいて混和の認められた KPF/ProOEt 1:1 混合物について、IL 形成の可否を評価するため PXRD, DSC, $^1\text{H-NMR}$ ならびに IR によりキャラクタリゼーションを実施した (Fig. 5). KPF と ProOEt のモル比 1:1 の液状混合物は無色透明であり、その PXRD パターンでは KPF の結晶成分に由来するピークは認められなかった (Fig. 5 a). また、DSC 測定では、 90°C 付近の KPF の融解に由来する吸熱ピークや、 170°C 以上の ProOEt の分解ピークは認められなかった (Fig. 5 b). さらに、得られた液体状混合物中の分子間相互作用を評価するため、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルならびに IR スペクトルを測定した. 液体状混合物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは、各成分に由来するピークの他にプロトン化アミンに由来する 6.3 ppm に新たなピークが認められた (Fig. 5 c). KPF とアミノ酸エステルから形成される KPF イオンにおいて、 $4.8\text{ -}6.38\text{ ppm}$ 範囲にプロトン化アミンに由来するスペクトルが見られることが報告されている[61]. このことから、本混合物において新たに認められたピークは、イオン化にともない出現するプロトン化された 2 級アミンによるものであると考えられる. また、IR 測定において、KPF では、 1650 および 1690 cm^{-1} に分子型カルボニルの伸縮振動に由来するピークが認められ[61][62], ProOEt では、アミノ基の伸縮振動に由来するブロードピーク[63]が 3450 cm^{-1} に認められた. これに対して、液体状混合物では、 1650 cm^{-1} の分子型ケトン由来のピークの僅かな高波数側へのシフトおよび 1690 cm^{-1} の分子型カルボニルによるピークの消失[62], 3450 cm^{-1} の ProOEt 由来ピークの消失が認められた (Fig. 5 d). これら $^1\text{H-NMR}$ および IR スペクトルの変化は、KPF と ProOEt 間のアミノ基とカルボニル基における新たな分子間相互作用の形成に起因することが示唆された. これらのことから、KPF と ProOEt をモル比 1:1 で混和した液状混合物中では IL を形成したと考えられた.

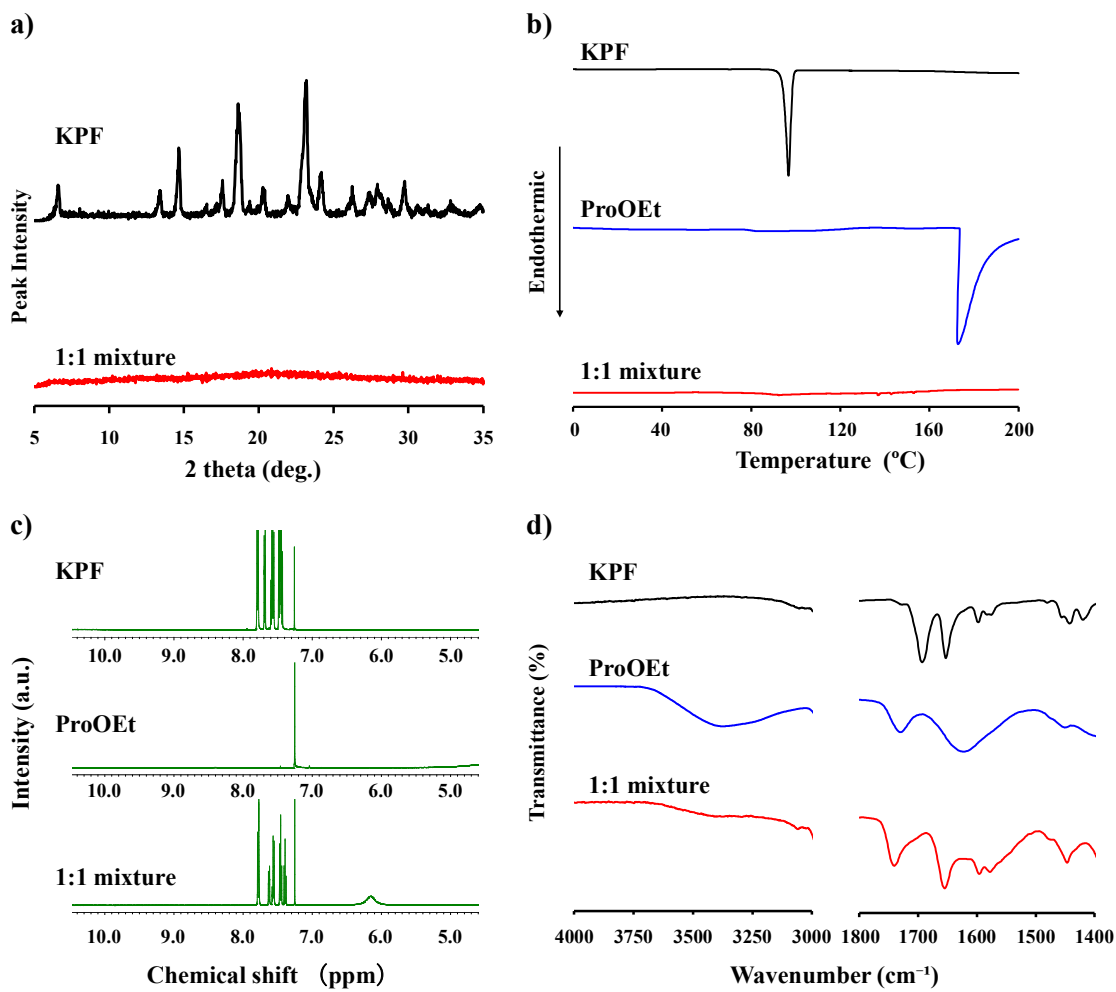


Fig. 5 a) XRD, b) DSC, c) ¹H-NMR and d) IR spectra of KPF, ProOEt and the liquid-state mixture.

2.2 IMC/ProOEt 1:3 混合物

スクリーニングにおいて混和の認められた IMC/ProOEt 1:3 混合物について、IL 形成の可否を評価するため PXRD, DSC, $^1\text{H-NMR}$ ならびに IR によりキャラクタリゼーションを実施した (Fig. 6). IMC と ProOEt のモル比 1:3 の液状混合物は無色透明であり、その PXRD パターンでは IMC の結晶成分に由来する回折ピークは認められなかった。

(Fig. 6 a) また、DSC 測定においては、 160°C 付近の IMC の融解に由来する吸熱ピークや、 170°C 以上における ProOEt の分解は認められなかった (Fig. 6 b). また、得られた液体状混合物中における分子間相互作用を評価するため、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル、IR スペクトルを測定した。液状混合物中における $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、KPF と同様にプロトン化アミンに由来するスペクトルが 5.9 ppm に新たに認められた (Fig. 6 c). さらに、IMC の液状混合物における IR スペクトルでは、単体において認められた 1690 および 1710 cm^{-1} の分子型カルボニル二量体ピーク [64] において、 1650 cm^{-1} へのピークシフトならびにピーク消失が認められた。これに加えて、ProOEt の 1630 cm^{-1} におけるアミドカルボニル基のピーク [65] が液状混合物のスペクトルにおいて消失した (Fig. 6 d). IMC 単体における分子型カルボニルに由来する 2 ピークのうち一方のピーク消失ならびに低波数側へシフトおよび ProOEt のアミドカルボニルのピークが消失したことから、IMC の一部のカルボニル基と ProOEt のアミン間において新たに相互作用し、IMC の COOH が部分的にイオン化され [66] [67] [68]、残りの部分が水素結合を形成したことが示唆された [69]. また、この水素結合の形成により、IL の形成に要する ProOEt 量が増加したと考えられた。これらのことから、IMC と ProOEt をモル比 1:3 で混和した液状混合物中においても、IL の形成が示唆された。

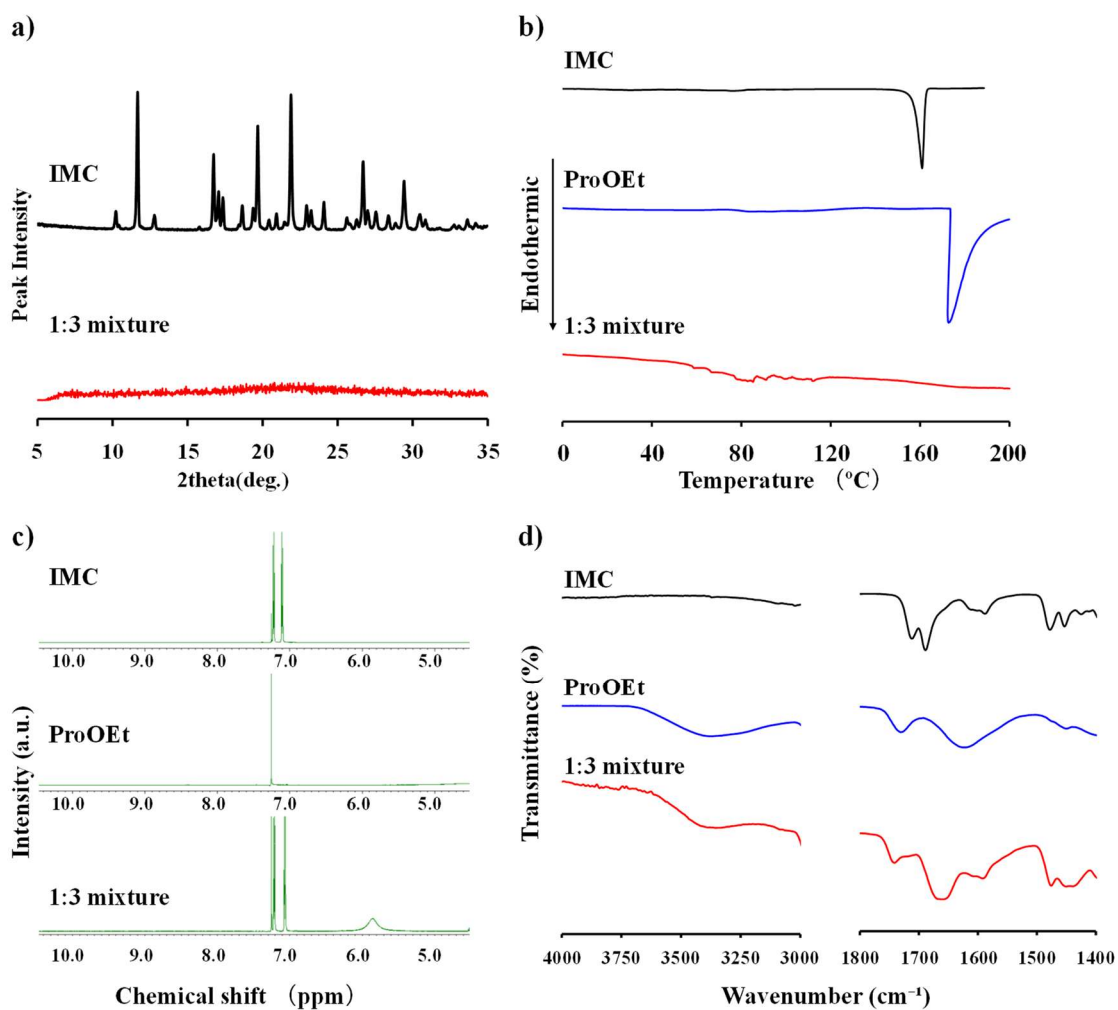


Fig. 6 a) PXRD, b) DSC, c) ¹H-NMR and d) IR spectra of IMC, ProOEt and the liquid-state mixture.

2.3 ETD/ProOEt 1:2 混合物

スクリーニングにおいて混和の認められた ETD/ProOEt 1:2 混合物について、IL 形成の可否を評価するため PXRD, DSC, $^1\text{H-NMR}$ ならびに IR によりキャラクタリゼーションを実施した (Fig. 7). ETD と ProOEt のモル比 1:2 の混合物は淡黄色で透明な液体であり、その PXRD パターンでは IMC の結晶成分に由来する回折ピークは認められなかった. (Fig. 7 a) また、DSC 測定においては、 150°C 付近の ETD の融解に由来する吸熱ピークや、ProOEt の分解に由来するスペクトルが消失し、 80°C 付近に単一のガラス転移点が認められた (Fig. 7 b). また、得られた液体状混合物中における分子間相互作用を評価するため、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル、IR スペクトルを測定したところ、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、ETD において認められた 8.6 ppm のシングレットピークが、液体状混合物では、 9.6 ppm へ低磁場シフトした. また、 5.3 ppm に新たなブロードピークが認められた (Fig. 7 c). 低磁場側へのピークシフトは、ETD のカルボキシル基のイオン化によるプロトン移動によるものであると考えられる[70]. また、新たに認められたブロードピークは、イオン化にともない出現するプロトン化された 2 級アミンによるものであると考えられる. さらに、IR 測定において、ETD では 1750 および 3300 cm^{-1} にそれぞれ分子型カルボキシル基およびカルボン酸ヒドロキシル基の伸縮振動に由来するピーク[71]が認められ、ProOEt では、アミノ基の伸縮振動に由来するブロードピーク[63]が 3450 cm^{-1} に認められた. これに対して、液体状混合物では、ETD において認められた 3300 cm^{-1} のピーク消失、 1750 cm^{-1} 付近のピーク強度の減弱および僅かな高波数側へのシフト、 3450 cm^{-1} の ProOEt 由来ピークの消失および 1550 cm^{-1} に新規ピークが認められた (Fig. 7 d). この 1550 cm^{-1} のピークの出現は、ETD のイオン化に由来することが報告されている[72]. さらに、分子型カルボニルに由来するピーク強度の減弱およびシフトから、水素結合の形成が示唆された. これら IR スペクトルの変化から、液体状混合物中において ETD は大部分がイオン型として存在し、スペクトルの変化が認められた官能基を介して ProOEt との間にイオン結合や水素結合による分子間相互作用を形成することが示唆された. また、IMC と同様に、水素結合の形成により ETD をイオン化

させるために必要な ProOEt 量が増加したと考えられる。

以上の結果から、KPF、IMC および ETD と ProOEt の各モル比率において得られた液体状混合物中では、NSAIDs のカルボニル基と ProOt のアミノ基間におけるイオン化に伴う分子間相互作用の変化が認められたことから、IL を形成したことが示唆された。

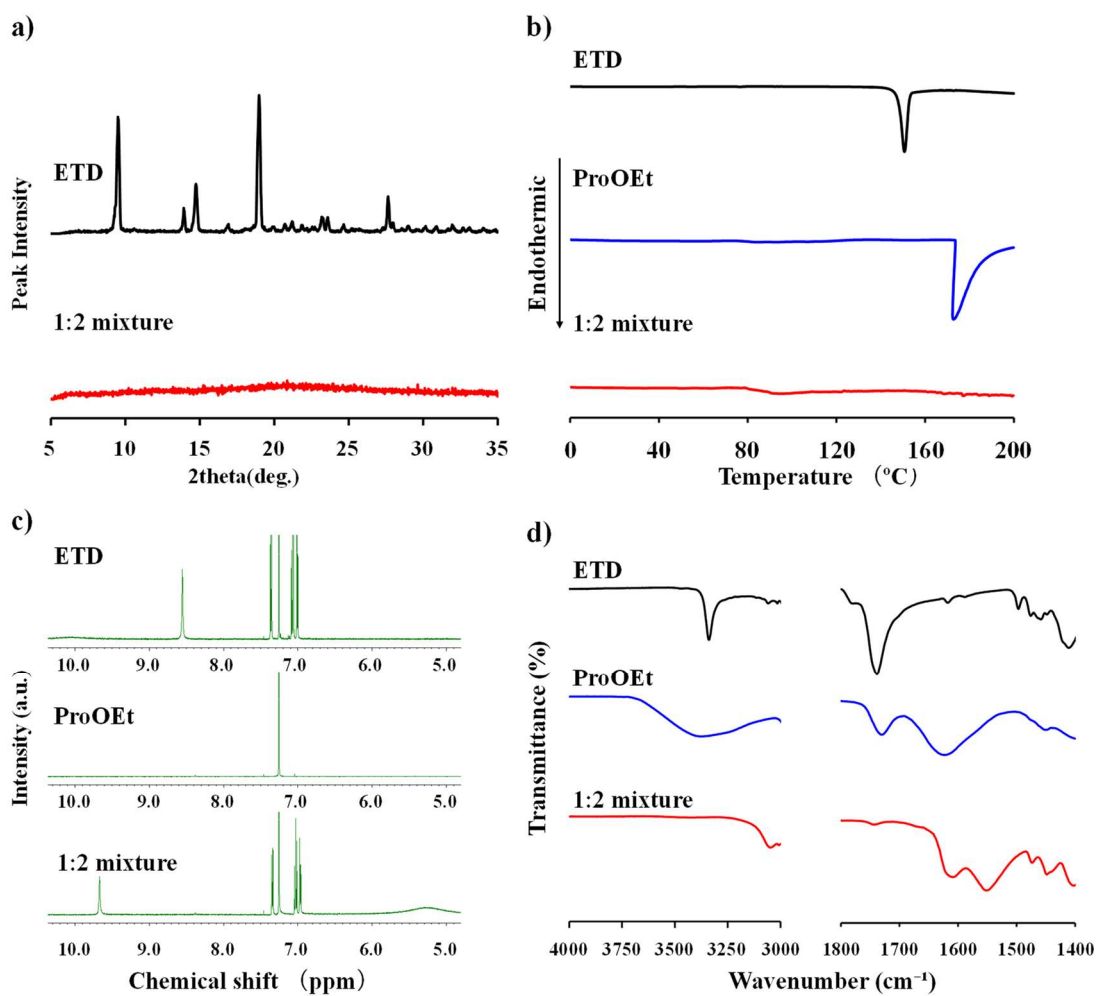


Fig. 7 a) PXRD, b) DSC, c) $^1\text{H-NMR}$ and d) IR spectra of ETD, ProOEt and the liquid-state mixture.

3. 疑似鼻粘液に対する溶解性試験

経鼻投与した薬物が鼻粘膜を透過するためには、鼻粘膜表面を覆う少量の鼻粘液に溶解する必要がある。鼻粘液に不溶な薬物は鼻粘膜から吸収されることなく、MCCにより鼻粘液とともに咽頭側へ排泄される[73]。そのため、水に対する溶解性が極めて低いNSAIDsは[74]、鼻粘液に溶解することなくMCCにより咽頭側へ排泄されることが懸念される。難水溶性薬物のIL化は薬物の溶解性を改善することが報告されている[55]。そこで、前項にて新たに見出した3種類のIL化したNSAIDsの鼻粘液に対する溶解性を明らかにするため、各ILを疑似鼻粘液に添加し溶解した各NSAIDs量を経時的に測定した(Fig. 8)。結晶状態である各NSAIDs単体を用いた結果、疑似鼻液への添加60分後にKPFは0.4 mM、IMCは0.25 mMおよびETDは0.4 mMとこれまでに報告される各薬物の溶解度に到達し[75]、その飽和状態は添加120分後まで維持された。これに対して、各NSAIDsからなるILでは、疑似鼻粘液への添加直後からNSAIDsの顕著な薬物濃度の増加が認められ、KPFでは115.2 mM、IMCでは124.5 mM、ETDでは194.5 mMであった。また、各NSAIDsの溶解性の改善は試験開始120分後まで持続した。NSAIDsからなる塩の溶解度は、15.1 mMから510 mMの範囲である[76]ことから、本試験における溶解性の改善は各NSAIDsのイオン化に起因するものと考えられた。以上の結果より、KPF、IMCおよびETDのProOEtによるイオン化は、各薬物の疑似鼻粘液に対する溶解性を顕著に改善することが明らかになった。また、MCCは、経鼻投与された薬物の90%以上を投与後120分までに咽頭へ排泄する[77][78]。そのため、3種類のNSAIDsからなるILは、いずれもMCCにより咽頭側に排泄されるまでの間、鼻粘膜表面における鼻粘液中にNSAIDsの高濃度層を形成ならびに維持することが示唆された。鼻粘液に対する溶解性が改善された3種類のNSAIDsはBSCクラスIIに分類され、単純拡散により粘膜の透過性は良好である[79]。したがって、IL化により溶解性が改善したKPF、IMCおよびETDを経鼻投与する場合、鼻粘膜透過性の向上に伴う鼻から脳への薬物送達の上昇が期待される。

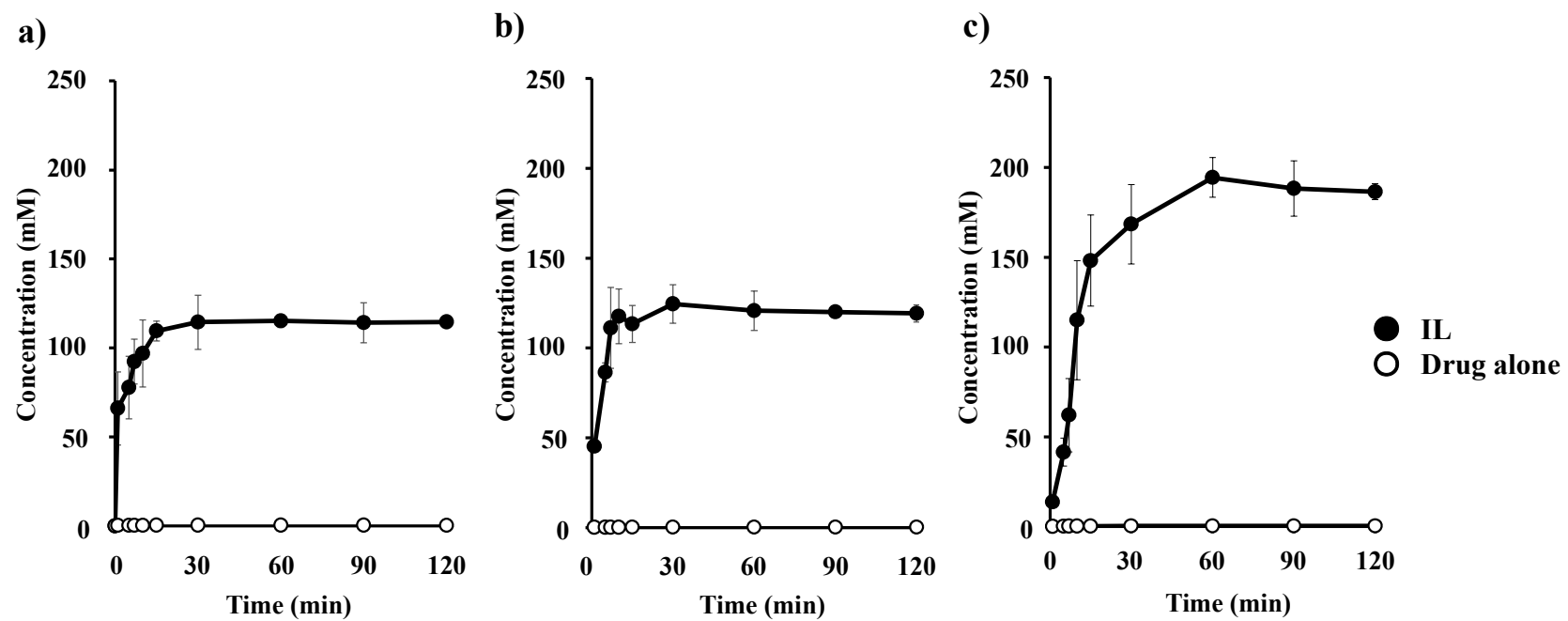


Fig. 8 Solubility test of a) KPF, b) IMC and c) ETD in the simulated nasal fluid (pH 5.5) at 34°C. (Mean \pm S.D., n = 3)

2-4 小括

経鼻投与による NSAIDs の効率的な脳送達性を達成する製剤設計のため、5 種類の NSAIDs と既報カウンターイオンの ProOEt を用いて、鼻腔内滞留性ならびに優れた鼻粘液に対する溶解性を併せもつことが期待される新たな IL のスクリーニングを実施した。そのなかで IL の形成が認められた組合せについて、疑似鼻粘液に対する溶解挙動を評価した。その結果、KPF, IMC, ETD の 3 種類の NSAIDs が ProOEt とイオン結合を主とした分子間相互作用を介して粘稠性の新たな IL を形成することを見出した。また、これら NSAIDs は、IL 化により疑似鼻粘液に対する溶解性が顕著に向上し、添加 120 分後まで鼻粘液層に NSAIDs の高濃度層を形成することが示唆された。以上より、3 種類の NSAIDs からなる IL は、その粘稠性による鼻腔内滞留性の改善ならびに鼻粘膜表面における薬物高濃度層の形成に起因する鼻粘膜透過性の向上により、NSAIDs を鼻から脳へ効率的に送達することが期待される。

第3章

ETD 含有 IL 経鼻投与後の鼻腔内滞留性 および脳移行性の評価

3-1 序論

経鼻投与における脳への薬物送達には、MCCによる薬物の排泄を抑制するために製剤に鼻腔内滞留性を付与することが有用である[80]。MCCによる薬物排泄は二相性クリアランスを示すことが報告されており、第1段階は15~20分で投与量の約50%が呼吸粘膜上から排泄され、第2段階はより緩徐に繊毛のない前庭領域および前中隔領域に沈着した薬物が排泄されて消化管側へ移行する[81]。*in situ* ゲルの利用は、MCCを抑制することで鼻腔内における滞留性を改善し、経鼻投与された薬物のバイオアベイラビリティを向上させる[82][83][84]。同様に、鼻腔内滞留性の付与により鼻から脳への移行性の改善された薬物による中枢神経系疾患に対する治療例も多数報告されており、NSAIDsによる脳内の炎症反応におけるCOX阻害もその1つである。COXはアラキドン酸カスケードにおいてアラキドン酸から生成される様々なPGの前駆体であるPGH₂への変換を触媒する酵素である[85]。PGは様々な組織、細胞において炎症、発熱、痛みの調節因子として作用し[85]、特にPGE₂は、PGH₂がミクロソームPGE₂合成酵素-1によりPGE₂に変換されることで産生され[86]、中枢においては神経の炎症や編成に関与し、胃や腎においては粘膜保護に関与することが報告されている[87]。そのため、炎症部位におけるPGE₂を選択的に抑制することが脳内における炎症反応を治療するための治療戦略として期待されている[88]。また、COXにはCOX-1およびCOX-2の2つのアイソザイムが存在する[89][90]。COX-1は胃腸粘膜等の体内におけるほとんどの組織において恒常的に発現しており[91]、COX-1が阻害されることで胃腸障害や腎障害のリスクとなり得る[92]。それに対して、COX-2は炎症部位において誘導されることで発現し、炎症部位周辺におけるPGE₂を産生する[93]。したがって、中枢神経系疾患の治療においてはCOX-2選択性を有するNSAIDsの炎症部位へ効率よく送達することにより、全身性副作用を抑えながら中枢における抗炎症効果を発揮することが期待される。

これまでに、中枢を標的とした経鼻投与製剤について、鼻腔内滞留性や投与した薬物による治療効果が評価されてきた。しかしながら、鼻腔内滞留性は製剤のレオロジー特性や実験動物の摘出鼻粘膜に対する付着力などによる間接的な方法により評価され、鼻粘膜に滞留した製剤量を測定した報告例は少ない。また、ILのような分子複合体を含有する経鼻投与製剤における鼻腔表面への薬物の滞留性を評価した報告やこれによる治療効果に関する報告はほとんどない。そこで、第2章においてILの形成が認められた3種類の

NSAIDsのうち、COX-2 選択性を有する ETD の IL を経鼻投与し[94][95], IL 化が ETD の鼻腔内滞留性, 脳移行性ならびに脳内炎症モデルにおける脳内 PGE₂抑制効果に及ぼす影響を評価した.

3-2 実験方法

1. ETD 単体ならびに ETD 含有 IL を用いた投与溶液の調製とその粘度測定

ETD および ProOEt から調製した IL 100 mg をヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸 (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethane sulfonic acid: HEPES) 緩衝液 100 μ L に溶解して、IL 溶液とした。対照の投与液として、50 mg の ETD を 200 μ L のジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO) および 100 μ L の HEPES 緩衝液に溶解し、ETD 溶液を調製した。IL 溶液 および ETD 溶液の 34°C における見かけ粘度を音叉振動型粘度計 (SV-10, A&D Co. Ltd., 東京, 日本) により測定した。

2. 実験動物

実験動物である ddY マウスを用いた動物実験は、日本大学動物実験委員会の承認 (AP20PHA022-1) を受けた後に実施した。4 週齢の ddY マウス (雄性) を日本エスエルシー株式会社 (静岡, 日本) より購入した。ddY マウスは、少なくとも 3 日間の予備飼育の後、体重 25~35 g に到達したマウスを実験に使用した[78]。なお、実験動物は制御された条件下 (温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクル (照明点灯時間午前 8 時~午後 8 時)) で飼育し、飼料および水を自由に摂取できるようにした。

3. 経鼻投与

イソフルラン (導入 4%, 維持 2%) 吸入麻酔下のマウスの鼻部を、経鼻投与用麻酔マスク (SN-487-70-09, シナノ製作所, 東京, 日本) で覆った。マスクのシリコン栓を開けた後、マイクロピペットを用いて、マウスの左右の鼻孔に IL 溶液または ETD 溶液 (ETD として 1.67 mg) を 1 分間隔で 8 回に分けて投与した。投与液は、マイクロチップの先端からの液滴を鼻腔付近に近づけ、マウスの自発呼吸に合わせて投与した。

4. 各組織中 ETD 量の測定

経鼻投与後の規定時間において、心臓から血液試料を採取後、リン酸緩衝生理食塩液 (phosphate buffered saline: PBS) による全身の還流した後にマウス頭部を断頭し、鼻粘膜、脳、食道、胃および小腸を摘出した。得られた血液試料 0.5 mL にメタノール 1 mL を加えて遠心分離し、上清を得た。脳、食道、胃および小腸の組織サンプルは、精製水 4 mL

を含む遠心管内で 55°C, 2 時間攪拌することによりホモジナイズした。ホモジナイズした組織懸濁液にメタノール 8 mL を加えてボルテックスミキサーで混合し, 3000 rpm で 15 分間遠心分離することにより懸濁液から薬物抽出液を得た。また, 鼻粘膜表面に残存する ETD 量を測定するため, 摘出した鼻腔の鼻孔側から咽頭側に精製水 500 μ L を 15 回繰り返し流すことで, 鼻粘膜洗浄液を得た。薬物抽出液および鼻粘膜洗浄液中の ETD 濃度は, サンプルを 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過した後, HPLC により定量した。組織移行性 (ID%) は, 次式を用いて, 投与量に対する各組織に分布した薬物の量から計算した。

$$ID \% = \frac{\text{ETD concentration in the samples}}{\text{ETD concentration in the solutions}}$$

4. リポ多糖類 (lipopolysaccharide: LPS) 誘発性脳内炎症モデルマウスにおける脳内 PGE₂ 量の測定

LPS 誘発脳内炎症モデルマウスは, LPS (Sigma-Aldrich Co., Wisconsin, USA) を, 初回用量として 4 mg/kg, 維持用量として 0.5 mg/kg を 3 日間連日マウスに腹腔内投与することによって作成した[96]。LPS 投与終了から 24 時間後に IL または ETD 溶液を鼻腔内に投与し, 60 分静置後に断頭した。脳抽出液は, 3 と同様に精製水 1 mL を用いて抽出した。脳抽出液中の PGE₂ の量は, Prostaglandin E₂ Express ELISA キット (Cayman Chemical, Michigan, USA) により定量した。コントロール群には, LPS 処置マウスに対して, いずれの投与液の投与も行わなかった。

5. 統計解析

統計解析はソフトウェア JMP[®]14.2 (SAS Institute Japan Co., Ltd., 東京, 日本) を使用した。結果は平均値±標準誤差として表している。Student's *t*-test (*t*-test) を使用して, 2 群間の平均値の差の優位性を評価した。また, 多群間における平均間の差の有意性は, 一元配置分散分析 (ANOVA) に続いて, Tukey-Kramer's HSD test により決定した。 $p < 0.05$ の時, 統計的有意性を示すこととした。

3-3 結果・考察

1. 各投与液の粘度測定

第2章において新たに見出したILのうち、最も溶解性が改善されかつ炎症を特異的に抑制することが期待されるCOX-2選択性NSAIDsのETD含有ILについて、脳を標的とした経鼻投与製剤としての有用性を評価した。最初に、ETD含有ILからなる投与液の鼻腔内温度の34°Cでの粘度を測定した（Table 2）。その結果、ETD溶液と比較して、IL溶液の粘度は約2倍に増加した。これより、ETDのIL化は、粘膜付着剤の添加した場合と同様に、ETDの鼻腔内滞留性を改善する可能性が示唆された。

Table 2 Viscosity of administered solutions at 34°C.

Samples	Viscosity (mPa·s)
ETD solution	7.7
IL solution	16.5

2. 経鼻投与後における ETD の組織分布

投与液の増粘により ETD の鼻腔内滞留性の改善が期待される ETD 含有 IL について、その投与液をマウスに経鼻投与し、ETD の鼻腔内滞留性ならびに脳をはじめとした各組織への移行性について評価した (Fig. 9). その結果、IL 溶液の鼻腔表面における ETD 量は投与後 60 分まで ETD 溶液より有意に高く、最大で 2 倍の値を示した (Fig. 9 a). また、IL 溶液の脳内の ETD 量は投与 30 分後に最大値を示した (Fig. 9 b). その値は ETD 溶液の約 7 倍に相当し、IL 溶液における脳内 ETD 量はいずれの時点においても ETD 溶液よりも有意に高い値だった。ETD は BCS 分類においてクラス II (溶解性が低く、膜透過性が高い) に分類される[97][98]. クラス II に分類される医薬品のバイオアベイラビリティを向上させるための一般的な製剤戦略として、粘膜表面における溶解性を改善させる必要がある[99]. 前章において、IL 化により ETD の鼻粘液に対する溶解性が改善されることが明らかとなったため、IL 溶液の経鼻投与後において、鼻腔表面に ETD の高濃度相を形成したことにより、鼻腔粘膜の内外で薬物濃度勾配が生じ鼻粘膜透過性を向上したものと考えられる。続いて、MCC による鼻腔から消化管への排泄を評価するため、経鼻投与後における鼻腔や咽頭からの排泄先である消化管あるいは血中への ETD 移行量について評価した (Fig. 10). 咽頭からつながる食道および胃では、IL 溶液と比べて、投与 30 分後まで ETD 溶液が 2 倍以上高い値を示し、60 分後に IL 溶液と同等の値となった (Fig. 10 a). 投与 90 分後には、胃の ETD 濃度は IL 溶液において高くなった (Fig. 10 b). また、小腸では投与後 15 分において各溶液間に有意な差は認められず、投与後 30 分では ETD 溶液が高値、60 分後には再び同程度の値を示した (Fig. 10 c). さらに、血中における ETD 濃度は投与後 15 分では IL 溶液、30 分では ETD 溶液がそれぞれ有意に高い値を示し、以降は同程度であった (Fig. 10 d). 経鼻投与された薬物が、MCC により鼻腔より速やかに排泄されると、薬物の脳移行性は低下する[100]. IL 溶液では、その粘度の高さから消化管側へ排泄される ETD 量が低下したことが示唆された。一方で、粘度の低い ETD 溶液では、MCC により速やかに排泄され消化管での分布量が増加したと考えられた。また、消化管移行は IL 化により遅延し、血中移行は投与後 30 分で向上することが示唆された。なお、本検討における投与容量は IL 溶液で 3.34 μL 、ETD 溶液で 10 μL であり、マウス鼻腔容量である 30 μL よりも少ないため[101]、投与した投与液は咽頭側へ漏れ出ることはないと考えられる。また、投与容量の増加により、鼻腔内滞留性が向上することがこれ

までに報告されている[20]. 本検討では, IL 溶液投与群の方が少ない容量で投与されているにも関わらず, 高い鼻腔内滞留性を示したため, 投与容量の違いによる影響はなかったと考えられる.

以上より, IL 溶液はその高い粘度により鼻腔内滞留性を向上し, 鼻粘膜上の鼻粘液に多量に溶解した ETD が鼻粘膜を透過することで, ETD の脳への移行性が増加することが示唆された. 同時に, 消化管を介した全身循環への ETD の移行も抑制され, 効率的に経鼻投与された薬物が効率的に脳へ移行するものと考えられた.

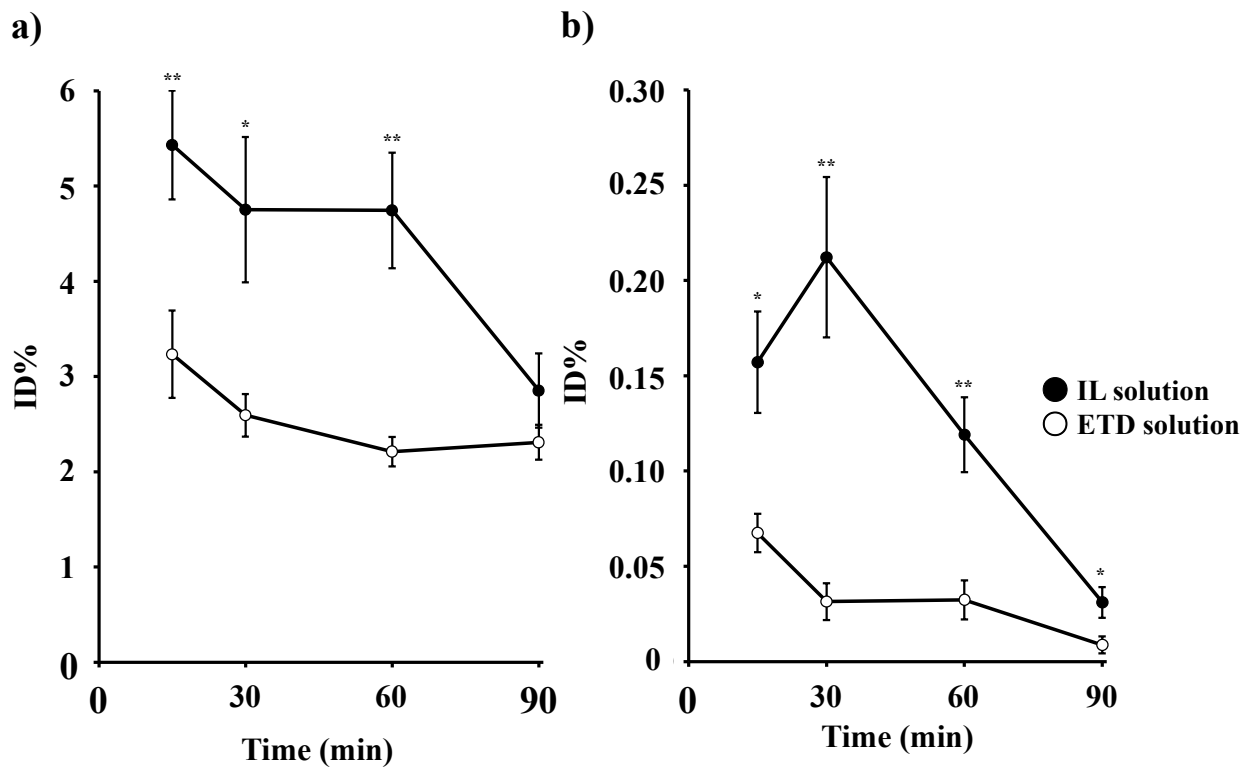


Fig. 9 Time course of the ID% of ETD in the (a) nasal cavity and (b) brain after intranasal administration. The open and closed circles indicate the ETD solution and IL solution, respectively (Mean \pm S.E. (n = 10) , ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ (*t*-test)) .

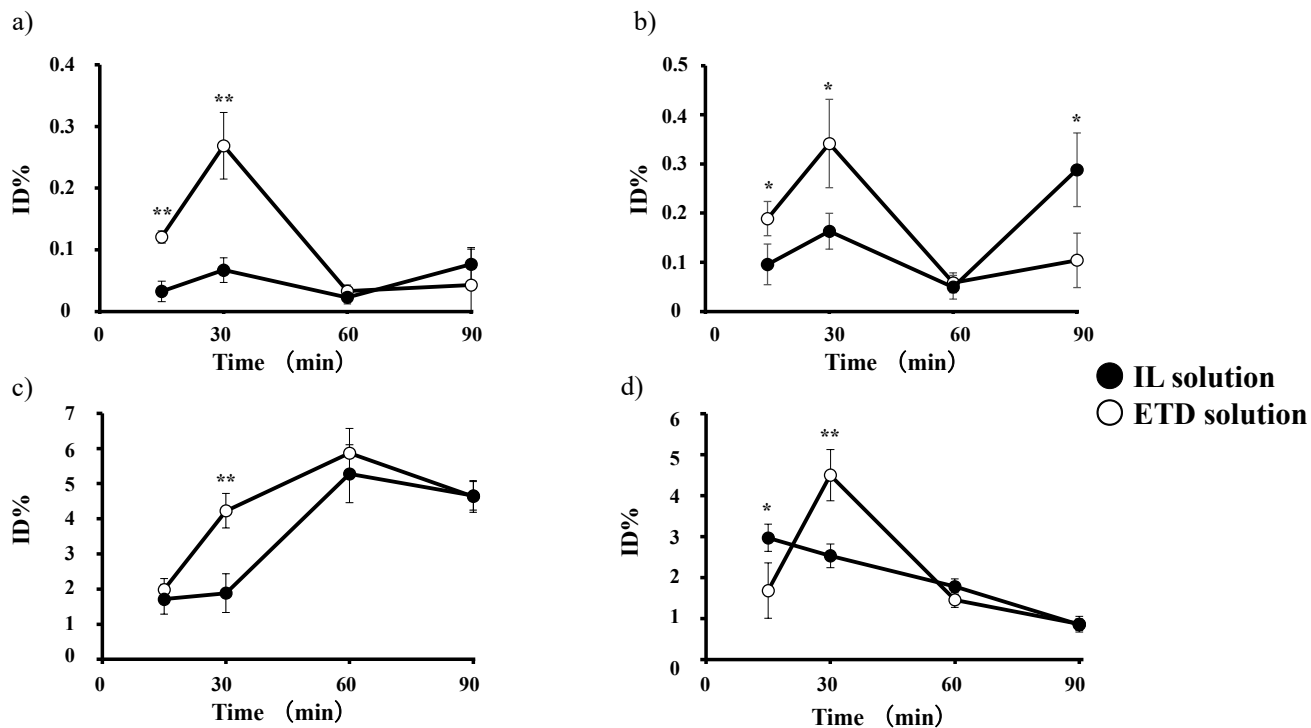


Fig. 10 Distribution of ETD in the (a) esophagus, (b) stomach, (c) small intestine, (d) plasma small intestine after intranasal administration. The open and closed circles indicate the ETD solution and IL solution, respectively (Mean \pm S.E. (n = 8–10) , ** p < 0.01, * p < 0.05 (t -test)

3. 脳内炎症モデルマウスにおける抗炎症効果

IL 化した ETD による脳内炎の抗炎症効果を明らかにするため、LPS 誘発性脳内炎症モデルマウスに対して ETD 含有 IL を経鼻投与することにより、炎症性マーカーの 1 つである脳内 PGE₂ 産生に及ぼす影響を評価した (Fig. 11). その結果、ETD 溶液を投与した群では薬物を経鼻投与しない未治療群との間に有意な差が認められなかったのに対して、ETD 含有 IL を投与した群では、モデルマウス脳内の PGE₂ 量が未治療群と比較して、約 40% まで有意に減少した. 脳内では、PGE₂ が誘導されるとミクログリアが活性化し、ケモカインおよびサイトカインが放出され、脳内の炎症を引き起こす[88]. PGE₂ はアラキドン酸カスケードの末端生成物であり、炎症時には COX-2 が本カスケードの律速酵素となることが知られている[102]. ETD は COX-2 を阻害することにより、PGE₂ の産生を抑制し抗炎症作用を示す[103] [104]. したがって、IL 化した ETD を経鼻投与したことで、抗炎症効果を期待できる ETD 量を脳内に送達できる可能性が示唆された.

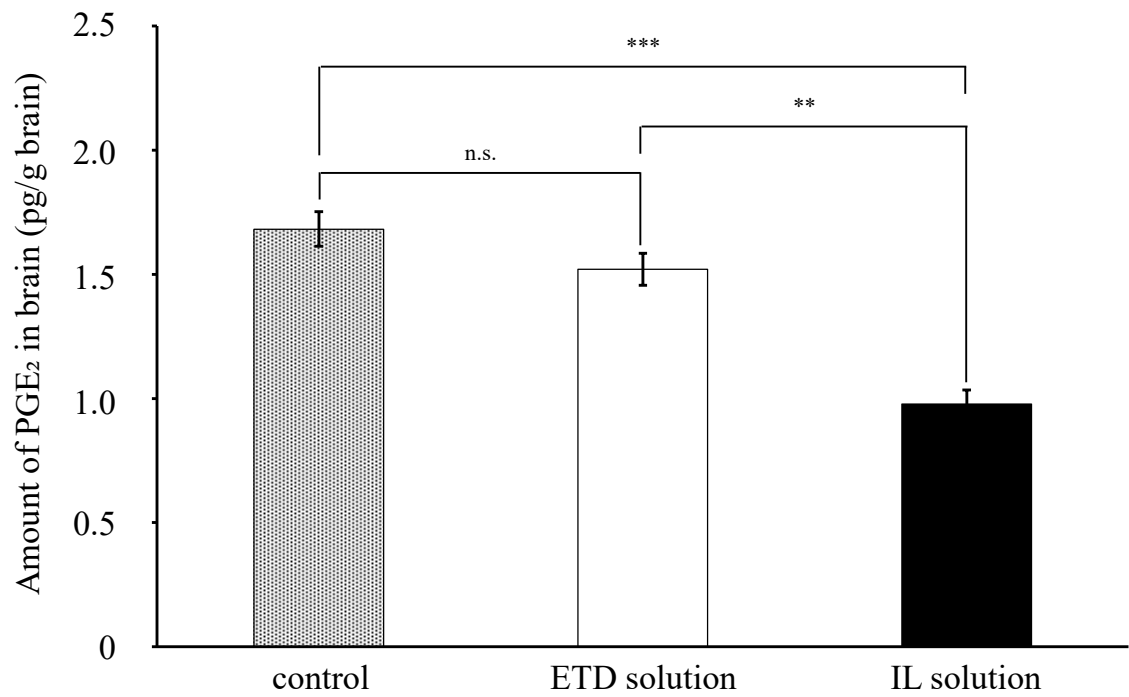


Fig. 11 Inhibition of LPS-induced PGE₂ by an intranasal administration of the IL solution. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 5) . *** p < 0.001, ** p < 0.01, n.s. p > 0.05, analysis of variance (ANOVA) with Tukey–Kramer's HSD test.

3-4 小括

ETD を含有する IL の経鼻投与が、ETD の鼻腔内滞留性、脳移行性の改善を示す有用な経鼻投与製剤となるかを明らかとするため、投与液の粘度ならびにマウスに対する経鼻投与後における鼻腔内滞留性、脳移行性および脳内 PGE₂ 産生抑制効果を評価した。

その結果、ETD 溶液と比較して、IL 化した ETD では投与液の粘度が約 2 倍に増粘したことより、経鼻投与後の鼻腔内滞留性が増加したと考えられた。これにともない、経鼻投与後の ETD の脳移行性が改善し、脳内炎症モデルマウスの脳内における PGE₂ 量を有意に低下させることを明らかとした。これらのことから、ETD を含有する IL の経鼻投与が、ETD の鼻腔内滞留性、脳移行性を改善する有用な経鼻投与製剤となることが明らかとなった。

第 4 章

総括

本研究では、NSAIDsの経鼻投与による脳への送達にILを適用することの有用性を明らかにすることを目的とし、NSAIDsのIL化による鼻粘液への溶解性への影響とIL化したNSAIDsの経鼻投与後における鼻腔内滞留性、脳移行性ならびに脳内炎症モデルマウスにおける脳内PGE₂の抑制効果について検討し、以下の知見を得た。

1. 3種類（KPF, IMC およびETD）のNSAIDsとProOEtとのそれぞれの液状混合物中においてILの形成が示唆され、疑似鼻粘液に対する各NSAIDsの溶解性が著しく改善されることを明らかにした。
2. IL化したETDの経鼻投与は薬物の鼻腔内滞留性の改善にともない、脳内炎症を抑制するために必要なETD量を脳内へ送達できることが示唆された。

上記の研究より、脳標的経鼻投与製剤の開発へのILの適用はNose-to-Brain経路による効率的な脳移行性に必要不可欠な製剤特性を付与できることが明らかとなった。今後、医薬品有効成分のILは脳を標的とする経鼻投与製剤の開発において価値のある製剤材料の1つになることが期待される。

引用文献

1. G.B.D.N.D.C. Group, "Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015". *Lancet Neurol.*, 2017. **16**(11): p. 877-897.DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30299-5.
2. E.R. Dorsey and B.R. Bloem, "The Parkinson Pandemic-A Call to Action". *JAMA Neurol.*, 2018. **75**(1): p. 9-10.DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.3299.
3. S.M. Allan and N.J. Rothwell, "Cytokines and acute neurodegeneration". *Nature Reviews Neuroscience*, 2001. **2**(10): p. 734-744.DOI: 10.1038/35094583.
4. G. Stoll, S. Jander, and M. Schroeter, "Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions". *Prog. Neurobiol.*, 1998. **56**(2): p. 149-171.DOI: 10.1016/s0301-0082(98)00034-3.
5. J.S. Rao, S.I. Rapoport, and H.W. Kim, "Altered neuroinflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers in postmortem Alzheimer's disease brain". *Transl Psychiatry*, 2011. **1**(8): p. e31.DOI: 10.1038/tp.2011.27.
6. F.Z. Shigeru Nogawa, M. Elizabeth Ross, and Costantino Iadecola, "Cyclo-Oxygenase-2 Gene Expression in Neurons ontributes to Ischemic Brain Damage". *The J. nruosci.*, 1997. **17**(8): p. 2746-2755.
7. P.S. Khansari and R.F. Halliwell, "Mechanisms Underlying Neuroprotection by the NSAID Mefenamic Acid in an Experimental Model of Stroke". *Front. Neurosci.*, 2019. **13**: p. 64.DOI: 10.3389/fnins.2019.00064.
8. E.E.N. Netland, J. L.; Majocho, R. E.; Tate, B. A., "Indomethacin Reverses the Microglial Response to Amyloid β -Protein". *Neurobiol. Aging*, 1998. **19**(3): p. 201-204.
9. J.M. Parepally, H. Mandula, and Q.R. Smith, "Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin". *Pharm. Res.*, 2006. **23**(5): p. 873-881.DOI: 10.1007/s11095-006-9905-5.
10. Q. Yue, Y. Peng, Y. Zhao, R. Lu, Q. Fu, Y. Chen, Y. Yang, L. Hai, L. Guo, and Y. Wu, "Dual-targeting for brain-specific drug delivery: synthesis and biological evaluation". *Drug Deliv.*, 2018. **25**(1): p. 426-434.DOI: 10.1080/10717544.2018.1431978.
11. Y. Li, Y. Zhou, J. Jiang, X. Wang, Y. Fu, T. Gong, X. Sun, and Z. Zhang, "Mechanism of

- brain targeting by dexibuprofen prodrugs modified with ethanolamine-related structures". *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2015. **35**(12): p. 1985-1994.DOI: 10.1038/jcbfm.2015.160.
12. S. Al-Azzawi, D. Masheta, A. Guildford, G. Phillips, and M. Santin, "A Peptide-Based Nanocarrier for an Enhanced Delivery and Targeting of Flurbiprofen into the Brain for the Treatment of Alzheimer's Disease: An In Vitro Study". *Nanomaterials (Basel)*, 2020. **10**(8).DOI: 10.3390/nano10081590.
 13. D.J. Begley, "Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities". *Pharmacol Ther*, 2004. **104**(1): p. 29-45.DOI: 10.1016/j.pharmthera.2004.08.001.
 14. B. Pavan, A. Dalpiaz, N. Ciliberti, C. Biondi, S. Manfredini, and S. Vertuani, "Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach". *Molecules*, 2008. **13**(5): p. 1035-1065.DOI: 10.3390/molecules13051035.
 15. Koki Ogawa, Naoya Kato, and S. Kawakami, "Recent Strategies for Targeted Brain Drug Delivery". *Chem. Pharm. Bull*, 2020. **68**: p. 567-582.
 16. M. Agrawal, S. Saraf, S. Saraf, S.G. Antimisiaris, M.B. Chougule, S.A. Shoyele, and A. Alexander, "Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs". *J. Control. Release*, 2018. **281**: p. 139-177.DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.05.011.
 17. T.P. Crowe, M.H.W. Greenlee, A.G. Kanthasamy, and W.H. Hsu, "Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain". *Life Sci.*, 2018. **195**: p. 44-52.DOI: 10.1016/j.lfs.2017.12.025.
 18. J.J. Lochhead and T.P. Davis, "Perivascular and Perineural Pathways Involved in Brain Delivery and Distribution of Drugs after Intranasal Administration". *Pharmaceutics*, 2019. **11**(11).DOI: 10.3390/pharmaceutics11110598.
 19. J.J. Lochhead, D.J. Wolak, M.E. Pizzo, and R.G. Thorne, "Rapid transport within cerebral perivascular spaces underlies widespread tracer distribution in the brain after intranasal administration". *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2015. **35**(3): p. 371-381.DOI: 10.1038/jcbfm.2014.215.
 20. M. Fukuda, T. Kanazawa, S. Iioka, T. Oguma, R. Iwasa, S. Masuoka, N. Suzuki, Y. Kosuge, and T. Suzuki, "Quantitative analysis of inulin distribution in the brain focused

- on nose-to-brain route via olfactory epithelium by reverse esophageal cannulation". *J. Control. Release*, 2021. **332**: p. 493-501.DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.02.024.
21. A. Tanaka, T. Furubayashi, M. Arai, D. Inoue, S. Kimura, A. Kiriya, K. Kusamori, H. Katsumi, R. Yutani, T. Sakane, and A. Yamamoto, "Delivery of Oxytocin to the Brain for the Treatment of Autism Spectrum Disorder by Nasal Application". *Mol. Pharm.*, 2018. **15**(3): p. 1105-1111.DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00991.
 22. M.J. Stenslik, A. Evans, F. Pomerleau, R. Weeks, P. Huettl, E. Foreman, J. Turchan-Cholewo, A. Andersen, W.A. Cass, Z. Zhang, R.C. Grondin, D.M. Gash, G.A. Gerhardt, and L.H. Bradley, "Methodology and effects of repeated intranasal delivery of DNSP-11 in awake Rhesus macaques". *J. Neurosci. Methods*, 2018. **303**: p. 30-40.DOI: 10.1016/j.jneumeth.2018.03.006.
 23. J. Born, T. Lange, W. Kern, G.P. McGregor, U. Bickel, and H.L. Fehm, "Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain". *Nat. Neurosci.*, 2002. **5**(6): p. 514-516.DOI: 10.1038/nn849.
 24. A. Pires, A. Fortuna, G. Alves, and A. Falcão, "Intranasal Drug Delivery: How, Why and What for?". *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2009. **12**(3): p. 288-311.DOI: 10.18433/j3nc79.
 25. L. Illum, "Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system". *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000. **11**: p. 1-18.
 26. L. Illum, "Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality?". *J Pharm Pharmacol*, 2004. **56**(1): p. 3-17.DOI: 10.1211/0022357022539.
 27. Z. Wang, G. Xiong, W.C. Tsang, A.G. Schatzlein, and I.F. Uchegbu, "Nose-to-Brain Delivery". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2019. **370**(3): p. 593-601.DOI: 10.1124/jpet.119.258152.
 28. F. Nakamura, R. Ohta, Y. Machida, and T. Nagai, "In vitro and in vivo nasal mucoadhesion of some water-soluble polymers". *Int. J. Pharm.*, 1996. **134**(1-2): p. 173-181.DOI: 10.1016/0378-5173(95)04416-7.
 29. S.A. Khan, K.S. Patil, and P.G. Yeole, "Intranasal mucoadhesive buspirone formulation: in vitro characterization and nasal clearance studies". *Pharmazie*, 2008. **63**(5): p. 348-351.DOI: 10.1691/ph.2008.7341.
 30. T.A. Ahmed, S.M. Badr-Eldin, O.A.A. Ahmed, and H. Aldawsari, "Intranasal optimized

- solid lipid nanoparticles loaded in situ gel for enhancing trans-mucosal delivery of simvastatin". *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2018. **48**: p. 499-508.DOI: 10.1016/j.jddst.2018.10.027.
31. N. Youssef, A.A. Kassem, R.M. Farid, F.A. Ismail, M.A.E. El-Massik, and N.A. Boraie, "A novel nasal almotriptan loaded solid lipid nanoparticles in mucoadhesive in situ gel formulation for brain targeting: Preparation, characterization and in vivo evaluation". *Int. J. Pharm.*, 2018. **548**(1): p. 609-624.DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.014.
 32. V.A. Schriever, T. Hummel, J.N. Lundstrom, and J. Freiherr, "Size of nostril opening as a measure of intranasal volume". *Physiol Behav*, 2013. **110-111**: p. 3-5.DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.12.007.
 33. X. Wang, N. Chi, and X. Tang, "Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008. **70**(3): p. 735-740.DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.07.005.
 34. E. Elmowafy, R. Osman, H. El-Shamy Ael, and G.A. Awad, "Nasal polysaccharides-glucose regulator microparticles: optimization, tolerability and antidiabetic activity in rats". *Carbohydr. Polym.*, 2014. **108**: p. 257-265.DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.02.064.
 35. L. Illum, "Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system". *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000. **11**(1): p. 1 - 18.DOI: 10.1016/S0928-0987(00)00087-7.
 36. R. Md Moshikur, M.R. Chowdhury, H. Fujisawa, R. Wakabayashi, M. Moniruzzaman, and M. Goto, "Design and Characterization of Fatty Acid-Based Amino Acid Ester as a New "Green" Hydrophobic Ionic Liquid for Drug Delivery". *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020. **8**(36): p. 13660-13671.DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c03419.
 37. Y. Sahbaz, H.D. Williams, T.H. Nguyen, J. Saunders, L. Ford, S.A. Charman, P.J. Scammells, and C.J.H. Porter, "Transformation of Poorly Water-Soluble Drugs into Lipophilic Ionic Liquids Enhances Oral Drug Exposure from Lipid Based Formulations". *Mol. Pharm.*, 2015. **12**(6): p. 1980-1991.DOI: 10.1021/mp500790t.
 38. D. Dobler, T. Schmidts, I. Klingenhofer, and F. Runkel, "Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems". *Int. J. Pharm.*, 2013. **441**(1-2): p. 620-627.DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.10.035.
 39. Y. Tahara, K. Morita, R. Wakabayashi, N. Kamiya, and M. Goto, "Biocompatible Ionic

- Liquid Enhances Transdermal Antigen Peptide Delivery and Preventive Vaccination Effect". *Mol. Pharm.*, 2020. **17**(10): p. 3845-3856.DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00598.
40. D.G. Yang, C. Liu, H.Q. Piao, P. Quan, and L. Fang, "Enhanced Drug Loading in the Drug-in-Adhesive Transdermal Patch Utilizing a Drug-Ionic Liquid Strategy: Insight into the Role of Ionic Hydrogen Bonding". *Mol. Pharm.*, 2021. **18**(3): p. 1157-1166.DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01054.
41. T. Loftsson and M.E. Brewster, "Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development". *J Pharm Pharmacol*, 2010. **62**(11): p. 1607-1621.DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x.
42. X. Shi, W. Huang, T. Xu, B. Fan, and X. Sheng, "Investigation of Drug–Polymer Miscibility and Solubilization on Meloxicam Binary Solid Dispersion". *J. Pharm. Innov.*, 2019. **15**(1): p. 125-137.DOI: 10.1007/s12247-019-09378-4.
43. A.T. Serajuddin, "Salt formation to improve drug solubility". *Adv Drug Deliv Rev*, 2007. **59**(7): p. 603-616.DOI: 10.1016/j.addr.2007.05.010.
44. T. Casian, E. Borbas, K. Ilyes, B. Demuth, A. Farkas, Z. Rapi, C. Bogdan, S. Iurian, V. Toma, R. Stiufiuc, B. Farkas, A. Balogh, G. Marosi, I. Tomuta, and Z.K. Nagy, "Electrospun amorphous solid dispersions of meloxicam: Influence of polymer type and downstream processing to orodispersible dosage forms". *Int J Pharm*, 2019. **569**: p. 118593.DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118593.
45. D.E. Alonzo, G.G. Zhang, D. Zhou, Y. Gao, and L.S. Taylor, "Understanding the behavior of amorphous pharmaceutical systems during dissolution". *Pharm. Res.*, 2010. **27**(4): p. 608-618.DOI: 10.1007/s11095-009-0021-1.
46. T. Khan, R. Ranjan, Y. Dogra, S.M. Pandya, H. Shafi, S.K. Singh, P.N. Yadav, and A. Misra, "Intranasal Eutectic Powder of Zolmitriptan with Enhanced Bioavailability in the Rat Brain". *Mol. Pharm.*, 2016. **13**(9): p. 3234-3240.DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00453.
47. M. Lotfi, M. Moniruzzaman, M. Sivapragasam, S. Kandasamy, M.I. Abdul Mutalib, N.B. Alitheen, and M. Goto, "Solubility of acyclovir in nontoxic and biodegradable ionic liquids: COSMO-RS prediction and experimental verification". *J. Mol. Liq.*, 2017. **243**:

- p. 124-131.DOI: 10.1016/j.molliq.2017.08.020.
48. W. Huang, X. Wu, J. Qi, Q. Zhu, W. Wu, Y. Lu, and Z. Chen, "Ionic liquids: green and tailor-made solvents in drug delivery". *Drug Discov. Today*, 2020. **25**(5): p. 901-908.DOI: 10.1016/j.drudis.2019.09.018.
 49. J. Xu, Y. Chen, X. Jiang, Z. Gui, and L. Zhang, "Development of Hydrophilic Drug Encapsulation and Controlled Release Using a Modified Nanoprecipitation Method". *Processes*, 2019. **7**(6).DOI: 10.3390/pr7060331.
 50. R. Nakamura, M. Tokuda, T. Suzuki, and H. Minami, "Preparation of Poly(ionic liquid) Hollow Particles with Switchable Permeability". *Langmuir*, 2016. **32**(10): p. 2331-2337.DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b00263.
 51. J.-i. Kadokawa, *Ionic Liquids - New Aspects for the Future*. 2013.
 52. X. Li, N. Ma, L. Zhang, G. Ling, and P. Zhang, "Applications of choline-based ionic liquids in drug delivery". *Int J Pharm*, 2022. **612**: p. 121366.DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121366.
 53. A. Vaidya and S. Mitragotri, "Ionic liquid-mediated delivery of insulin to buccal mucosa". *Journal of Controlled Release*, 2020. **327**: p. 26-34.DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.037.
 54. L. Zheng, Z. Zhao, Y. Yang, Y. Li, and C. Wang, "Novel skin permeation enhancers based on amino acid ester ionic liquid: Design and permeation mechanism". *Int. J. Pharm.*, 2020. **576**: p. 119031.DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119031.
 55. E. Swiatek, P. Ossowicz-Rupniewska, E. Janus, A. Nowak, P. Sobolewski, W. Duchnik, L. Kucharski, and A. Klimowicz, "Novel Naproxen Salts with Increased Skin Permeability". *Pharmaceutics*, 2021. **13**(12).DOI: 10.3390/pharmaceutics13122110.
 56. R.M. Moshikur, M.R. Chowdhury, R. Wakabayashi, Y. Tahara, M. Moniruzzaman, and M. Goto, "Characterization and cytotoxicity evaluation of biocompatible amino acid esters used to convert salicylic acid into ionic liquids". *Int J Pharm*, 2018. **546**(1-2): p. 31-38.DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.021.
 57. H. Nazar, D.G. Fatouros, S.M. van der Merwe, N. Bouropoulos, G. Avgouropoulos, J. Tsibouklis, and M. Roldo, "Thermosensitive hydrogels for nasal drug delivery: the formulation and characterisation of systems based on N-trimethyl chitosan chloride". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011. **77**(2): p. 225-232.DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.11.022.

58. B.C. Hancock and G. Zografi, "Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems". *J. Pharm. Sci.*, 1997. **86**(1): p. 1-12.DOI: 10.1021/js9601896.
59. M. Ochi, K. Kimura, A. Kanda, T. Kawachi, A. Matsuda, K. Yuminoki, and N. Hashimoto, "Physicochemical and Pharmacokinetic Characterization of Amorphous Solid Dispersion of Meloxicam with Enhanced Dissolution Property and Storage Stability". *AAPS PharmSciTech*, 2016. **17**(4): p. 932-939.DOI: 10.1208/s12249-015-0422-x.
60. V.G.S.S. Jyothi, J. Pawar, V. Fernandes, R. Kumar, C. Singh, S.B. Singh, J. Madan, and D.K. Khatri, "Film forming topical dermal spray of meloxicam attenuated pain and inflammation in carrageenan-induced paw oedema in Sprague Dawley rats". *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2022. **70**.DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103195.
61. J. Klebeko, P. Ossowicz-Rupniewska, A. Nowak, E. Kucharska, Ł. Kucharski, W. Duchnik, Ł. Struk, A. Klimowicz, and E. Janus, "Cations of amino acid alkyl esters conjugated with an anion from the group of NSAIDs – As tunable pharmaceutical active ionic liquids". *J. Mol. Liq.*, 2023. **384**.DOI: 10.1016/j.molliq.2023.122200.
62. G. Chantereau, M. Sharma, A. Abednejad, B.M. Neves, G. Sèbe, V. Coma, M.G. Freire, C.S.R. Freire, and A.J.D. Silvestre, "Design of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Based Ionic Liquids with Improved Water Solubility and Drug Delivery". *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019. **7**(16): p. 14126-14134.DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b02797.
63. I. Nugrahani, D. Utami, S. Ibrahim, Y.P. Nugraha, and H. Uekusa, "Zwitterionic cocrystal of diclofenac and l-proline: Structure determination, solubility, kinetics of cocrystallization, and stability study". *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2018. **117**: p. 168-176.DOI: 10.1016/j.ejps.2018.02.020.
64. G. Kasten, K. Nouri, H. Grohgan, T. Rades, and K. Lobmann, "Performance comparison between crystalline and co-amorphous salts of indomethacin-lysine". *Int J Pharm*, 2017. **533**(1): p. 138-144.DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.063.
65. S.A. Chaubey, N. Patra, and R. Mishra, "Synthesis of novel proline-based imidazolium ionic liquids". *Monatshfte für Chemie - Chemical Monthly*, 2020. **151**(9): p. 1409-1417.DOI: 10.1007/s00706-020-02670-x.
66. X. Chen, U.J. Griesser, R.L. Te, R.R. Pfeiffer, K.R. Morris, J.G. Stowell, and S.R. Byrn,

- "Analysis of the acid-base reaction between solid indomethacin and sodium bicarbonate using infrared spectroscopy, X-ray powder diffraction, and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy". *J Pharm Biomed Anal*, 2005. **38**(4): p. 670-677.DOI: 10.1016/j.jpba.2005.02.017.
67. R. Ojarinta, A.T. Heikkinen, E. Sievanen, and R. Laitinen, "Dissolution behavior of co-amorphous amino acid-indomethacin mixtures: The ability of amino acids to stabilize the supersaturated state of indomethacin". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2017. **112**: p. 85-95.DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.11.023.
68. K. Lobmann, R. Laitinen, C. Strachan, T. Rades, and H. Grohgan, "Amino acids as co-amorphous stabilizers for poorly water-soluble drugs--Part 2: molecular interactions". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2013. **85**(3 Pt B): p. 882-888.DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.03.026.
69. M. Fiandaca, G. Dalwadi, R. Wigent, and P. Gupta, "Ionic liquid formation with deep eutectic forces at an atypical ratio (2:1) of naproxen to lidocaine in the solid-state, thermal characterization and FTIR investigation". *Int J Pharm*, 2020. **575**: p. 118946.DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118946.
70. S.-y. Furukawa, G. Hattori, S. Sakai, and N. Kamiya, "Highly efficient and low toxic skin penetrants composed of amino acid ionic liquids". *RSC Advances*, 2016. **6**(90): p. 87753-87755.DOI: 10.1039/c6ra16926k.
71. C. Wang, S.A. Chopade, Y. Guo, J.T. Early, B. Tang, E. Wang, M.A. Hillmyer, T.P. Lodge, and C.C. Sun, "Preparation, Characterization, and Formulation Development of Drug-Drug Protic Ionic Liquids of Diphenhydramine with Ibuprofen and Naproxen". *Mol. Pharm.*, 2018. **15**(9): p. 4190-4201.DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00569.
72. G. Kasten, L. Lobo, S. Dengale, H. Grohgan, T. Rades, and K. Lobmann, "In vitro and in vivo comparison between crystalline and co-amorphous salts of naproxen-arginine". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018. **132**: p. 192-199.DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.09.024.
73. S.K.S. Kushwaha, R.K. Keshari, and Rai, "Advances in nasal trans-mucosal drug delivery". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011. **1**(7): p. 21 - 28.
74. Y. Tsume, P. Langguth, A. Garcia-Arieta, and G.L. Amidon, "In silico prediction of drug dissolution and absorption with variation in intestinal pH for BCS class II weak acid drugs: ibuprofen and ketoprofen". *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 2012.

- 33(7)**: p. 366-377.DOI: 10.1002/bdd.1800.
75. Y. Miwa, H. Hamamoto, and T. Ishida, "Lidocaine self-sacrificially improves the skin permeation of the acidic and poorly water-soluble drug etodolac via its transformation into an ionic liquid". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2016. **102**: p. 92-100.DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.03.003.
76. S.E. David, P. Timmins, and B.R. Conway, "Impact of the counterion on the solubility and physicochemical properties of salts of carboxylic acid drugs". *Drug Dev Ind Pharm*, 2012. **38(1)**: p. 93-103.DOI: 10.3109/03639045.2011.592530.
77. J.C. Ho, K.N. Chan, W.H. Hu, W.K. Lam, L. Zheng, G.L. Tipoe, J. Sun, R. Leung, and K.W. Tsang, "The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2001. **163(4)**: p. 983-988.DOI: 10.1164/ajrccm.163.4.9909121.
78. A. Pires, A. Fortuna, G. Alves, and A. Falcão, "Intranasal Drug Delivery: How, Why and What for?". *J Pharm Pharmaceut Sci* 2009. **12(3)**: p. 288-311.DOI: 10.18433/j3nc79.
79. M. Ahirrao and S. Shrotriya, "In vitro and in vivo evaluation of cubosomal in situ nasal gel containing resveratrol for brain targeting". *Drug Dev Ind Pharm*, 2017. **43(10)**: p. 1686-1693.DOI: 10.1080/03639045.2017.1338721.
80. R.J. Soane, M. Frier, A.C. Perkins, N.S. Jones, S.S. Davis, and L. Illum, "Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans". *Int. J. Pharm.*, 1999. **178**: p. 55-65.
81. N.G.M. Emmeline Martin, Schipper, J., Coos Verhoef, and F.W.H.M. Merkus, "Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery.". *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998. **29**: p. 13-38.
82. M. Rao, D.K. Agrawal, and C. Shirsath, "Thermoreversible mucoadhesive in situ nasal gel for treatment of Parkinson's disease". *Drug Dev Ind Pharm*, 2017. **43(1)**: p. 142-150.DOI: 10.1080/03639045.2016.1225754.
83. P.R. Ravi, N. Aditya, S. Patil, and L. Cherian, "Nasal in-situ gels for delivery of rasagiline mesylate: improvement in bioavailability and brain localization". *Drug Deliv.*, 2015. **22(7)**: p. 903-910.DOI: 10.3109/10717544.2013.860501.
84. S. Sharma, S. Lohan, and R.S. Murthy, "Formulation and characterization of intranasal

- mucoadhesive nanoparticles and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery". *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2014. **40**(7): p. 869-878.DOI: 10.3109/03639045.2013.789051.
85. T. Tanabe and N. Tohnai, "Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression". *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2002. **68-69**: p. 95-114.DOI: 10.1016/S0090-6980(02)00024-2.
 86. A.V. Sampey, S. Monrad, and L.J. Crofford, "Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E2". *Arthritis Res. Ther.*, 2005. **7**(3): p. 114-117.DOI: 10.1186/ar1748.
 87. W. Tomisato, S. Tsutsumi, T. Hoshino, H.J. Hwang, M. Mio, T. Tsuchiya, and T. Mizushima, "Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions". *Biochem. Pharmacol.*, 2004. **67**(3): p. 575-585.DOI: 10.1016/j.bcp.2003.09.020.
 88. J. Jiang, Y. Quan, T. Ganesh, W.A. Pouliot, F.E. Dudek, and R. Dingledine, "Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013. **110**(9): p. 3591-3596.DOI: 10.1073/pnas.1218498110.
 89. A.L. Blobaum and L.J. Marnett, "Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition". *J. Med. Chem.*, 2007. **50**(7): p. 1425-1441.DOI: 10.1021/jm0613166.
 90. K. Yasojima, C. Schwab, E.G. McGeer, and P.L. McGeer, "Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs". *Brain Res.*, 1999. **830**(2): p. 226-236.DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01389-X.
 91. Y.Z. Christopher J. Smith, Carol M. Koboldt, Jerry Muhammad, Ben S. Zweifel, , Alex Shaffer, John J. Talley, and K.S. Jaime L. Masferrer, and Peter C. Isakson, "Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998. **95**(22): p. 13313-13318.
 92. L M Jackson, K C Wu, Y R Mahida, D. Jenkins, and C.J. Hawkey, "Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa". *Gut*, 2000. **47**(6): p. 762-770.DOI: 10.1136/gut.47.6.762.
 93. F.G. Timothy D. Warner, Ivana Vojnovic, Antoaneta Bukasa, Jane A. Mitchell, and John

- R. Vane, "Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999. **96**: p. 7563-7568.
94. K.B. Glaser, "Cyclooxygenase selectivity and NSAIDs: Cyclooxygenase-2 selectivity of etodolac (LODINE)". *InflammoPharmacology* 1995. **3**: p. 335-345.
95. L. Laine, "Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient". *Gastroenterology*, 2001. **120**(3): p. 594-606. DOI: 10.1053/gast.2001.21907.
96. D. Manickavasagam, L. Lin, and M.O. Oyewumi, "Nose-to-brain co-delivery of repurposed simvastatin and BDNF synergistically attenuates LPS-induced neuroinflammation". *Nanomedicine*, 2020. **23**: p. 102107. DOI: 10.1016/j.nano.2019.102107.
97. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison, "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability". *Pharm. Res.*, 1995. **12**(3): p. 413-420. DOI: 10.1023/a:1016212804288.
98. A.P. Sherje, V. Kulkarni, M. Murahari, U.Y. Nayak, P. Bhat, V. Suvarna, and B. Dravyakar, "Inclusion Complexation of Etodolac with Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and Auxiliary Agents: Formulation Characterization and Molecular Modeling Studies". *Mol. Pharm.*, 2017. **14**(4): p. 1231-1242. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01115.
99. S.K. Rai, S. Allu, and A.K. Nangia, "Salts and Cocrystal of Etodolac: Advantage of Solubility, Dissolution, and Permeability". *Crystal Growth & Design*, 2020. **20**(7): p. 4512-4522. DOI: 10.1021/acs.cgd.0c00313.
100. M.I. Ugwoke, N. Verbeke, and R. Kinget, "The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2001. **53**(1): p. 3-21. DOI: 10.1211/0022357011775145.
101. M.J. Ruigrok and E.C. de Lange, "Emerging Insights for Translational Pharmacokinetic and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies: Towards Prediction of Nose-to-Brain Transport in Humans". *AAPS J*, 2015. **17**(3): p. 493-505. DOI: 10.1208/s12248-015-9724-x.
102. M. Font-Nieves, M.G. Sans-Fons, R. Gorina, E. Bonfill-Teixidor, A. Salas-Perdomo, L.

- Marquez-Kisinousky, T. Santalucia, and A.M. Planas, "Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes". *J. Biol. Chem.*, 2012. **287**(9): p. 6454-6468.DOI: 10.1074/jbc.M111.327874.
103. H. Suyama, M. Kawamoto, S. Gaus, and O. Yuge, "Effect of etodolac, a COX-2 inhibitor, on neuropathic pain in a rat model". *Brain Res.*, 2004. **1010**(1-2): p. 144-150.DOI: 10.1016/j.brainres.2004.03.014.
104. R.A. Jones, "Etodolac: An overview of a selective COX-2 inhibitor ". *Inflammopharmacology*, 1999. **7**(3): p. 269-275.DOI: 10.1007/s10787-999-0010-3.

学術雑誌掲載論文目録

本論文は、次の論文を基礎とするものである。

Hiroaki Tanigawa, Naoto Suzuki, Toyofumi Suzuki. Application of ionic liquid to enhance the nose-to-brain delivery of etodolac. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022; **178**:106290.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲をいただきました日本大学 薬学部 薬剤学研究室 教授 鈴木 豊史 先生に衷心より深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に際し、研究全体の計画や遂行および学术论文の執筆など、さまざまな面において御指導・御鞭撻を賜り、激励の言葉をかけてくださりました日本大学 薬学部 薬剤学研究室 専任講師 鈴木 直人 先生に謹んで深く感謝の意を表します。ならびに、本研究の一部にご協力いただきました日本大学 薬学部 薬剤学研究室の卒業生に心から感謝致します。

本論文を審査していただき、有益な御助言と御校閲を賜りました日本大学 薬学部 薬品物理化学研究室 教授 田口 博之 先生、ならびに日本大学 薬学部 臨床薬物動態学研究室教授 辻 泰弘 先生に深謝いたします。

最後に、私の学生生活および研究活動を温かく見守り、支え続けてくれた両親と家族に心から感謝いたします。