

3 高分子ミセル

3.1 高分子ミセル薬物キャリアとは¹⁻⁴

高分子ミセルとはその名の通り、高分子から成るミセル構造のことである。ある分子中に溶解に溶けやすい部分（ここではAとする）と溶けにくい部分（Bとする）が共存した場合に、Bの部分が含まれて形成する構造がミセルである。低分子両親媒性脂質から成るミセル構造の場合に知られているように、ミセルには大別すると球状ミセルと棒状ミセルがある。高分子ミセルの場合にも、棒状のミセルが薬物キャリアとしての検討が始められたが⁴、本建設は球状ミセルのみを扱う。また、脂質から成る会合体のもう1つの方式は二分子鎖の小胞体であるリポソームであり、高分子から成るものとして相当するのはポリマーソームである。ポリマーソームの薬物キャリアとしての検討も始められたばかりと驚くところである。

高分子ミセルの場合には、高分子構造中にAとBの構造が含まれていれば形成し得るのであるが、明確な構造を取りやすいのはグラフトコポリマーやブロックコポリマーのように、AとBが高分子鎖になっっている場合である。この高分子の合成については3.3項に述べる。

図1にAB型ブロックコポリマーから成る高分子ミセル型薬物キャリアシステム⁵の例を示す。これは直鎖状の高分子鎖であるA鎖とB鎖が並列にながった形のブロックコポリマーであり、高分子ミセル型薬物キャリアシステムとして最も典型的なものである。生体の体液中で使うので、A鎖は水あるいは緩衝液に溶ける構造のもので、B鎖はこの溶液中で相互作用を及ぼして会合する性質のものである。封入する薬物が疎水性である場合が多いので、典型的な高分子ミセルキ

リアではB鎖は疎水性になる。以下はB鎖が疎水性の場合を説明し、それ以外の相互作用を用いる場合は次項3.2.4で説明する。

このAB型ブロックコポリマーが、数十～数百個を合してB鎖が疎水性の内核を、A鎖は親水性の外殻を構成した球状のミセル構造を形成する。ミセルに導入する薬物は、B鎖に化学的に結合するか、B鎖が形成するミセル内核に物理的に主に疎水性相互作用で封入される。1つのミセルを形成するポリマー鎖の数は、A鎖とB鎖の化学構造と長さによって規定される。

古典的には、ミセル構造を含む溶液にはミセル構造と、この構造を形成しない状態で溶解に溶けているブロックコポリマー（ユニマーと呼ぶ）が共存し、このときのユニマー濃度を臨界ミセル濃度（Critical Micelle Concentration: CMC）と呼ぶ。ユニマー濃度がCMC以上になるとミセル構造を形成し始め、高分子濃度が増加してもミセルの濃度が増加するだけで、ユニマー濃度はほぼCMCに一定に保たれる。このCMCについて、高分子ミセルにおいて、重要なことが2つある。

その第一はCMCの小ささである（つまり、低い高分子濃度でミセル構造を形成できる）。高分子ミセルではそのCMCの値が低分子の界面活性剤の場合と比べるとずっと小さく、通常1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と小さな値を取ることが知られている⁵。つまり、投与後の血液による希釈後も、血液中のポリマー濃度が十分にCMCより大きく、ミセル構造が血液内でクーゲリングに必要となる時間保たれることである。ここで少し、計算を試みる。臨界ミセル濃度が3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、投与量3 mg/kg の薬物を、薬物含有量10 wt%の高分子ミセルで投与する場合を想定する。これを血液中に投与すると溶液中の高分子濃度は3 $\text{mg}/\text{kg} \times 10/70 = 0.4 \text{ mg}/\text{mL}$ 位となる（血液量は体重1 kg 当たり70 mL とした）。この値は臨界ミセル濃度よりも100倍以上高い濃度であることから、血液内に投与してからその濃度が1/100未満に減衰するまでの充分に長い時間（ユニマーではなく）高分子ミセルとしてアリババリーを実現することができる。このようにCMCに基づいてミセル構造の安定性をここでは静的安定性と分類する。

これに対し、第二の重要な点は動的な高分子ミセル構造の安定性である。古典的定義では、ミセルとはユニマーとの間で平衡が成立しているものを指すのであるが、高分子ミセルの場合には内核が固体の性質を持つときに、ミセル構造がユニマーへと解離してゆく速度がゼロあるいは大変小さくなる時がある。前述の静的な安定性とともにもっとめだのが図2である。もし、内核が完全な固体の性質を示してユニマーに解離しなくなつたときには、ミセル構造はユニマーとの間の平衡ではなく、解離しない粒子として振舞うことになる（平衡であつたり平衡でなかつたりと微妙に思われるかも知れないが、例えばミセル形成過程ではミセル内核が液体状態の高温で行い、その後低温にしてミセル内核を固体にする場合などが考えられる）。一般に、生体内では血液内濃度を下げる排出経路は放多々ある。ここでミセルが完全な平衡関係にある場合を想定し

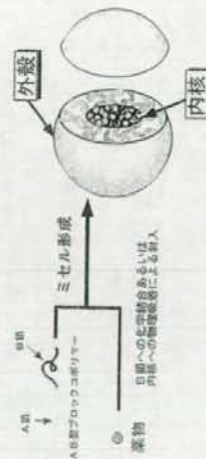


図1 典型的な高分子ミセル薬物キャリアシステムの構造

* Masayuki Yokoyama 00 神奈川科学技術アカデミー 横山高分子ナノシステムプロジェクト エクト プロジェクトリーダー

1. 静的安定性が高い = ミセル形成の平衡定数 K が大きい
 → 脂質ミセル形成(ミセル形成が阻害し得た時のユニマー濃度)が小さい
2. 動的安定性が高い = ミセル解離の速度定数 k_2 が小さい
 特ニ、ミセル内核が完全に固体状態になると $k_2 = 0$ となり
 ユニマーと平衡関係にない固体粒子となる

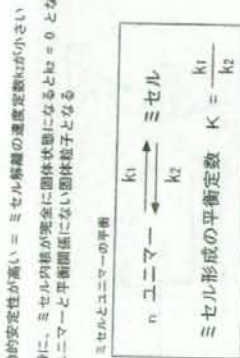


図2 高分子ミセルの静的および動的安定性

てみる。投与したときの高分子の濃度はCMCよりも圧倒的に高くても、ユニマーが腎臓や肝臓から急激に排出された場合に平衡がミセルからユニマーに急速に移行することも考えられる。その場合には、ミセル構造は短時間で失われることとなる。このときに、もしミセル内核が固体性を示して解離の速度がゼロではないにしても、相当に小さなものであれば、長い時間血液内でミセル構造でのデリバリが可能となるのである。置薬を換えて言うと、ミセルとユニマー間の平衡移動が速く、ポリマー濃度などの条件を変えても同時に新たな平衡が成立するものを「古典的」ミセルと呼ぶとすると、高分子ミセルでは「非古典的」なミセルとなることもあり、それがターゲティングに有益に利用し得るということである。

生体内でのターゲティングのためには、動的なミセル構造の安定性は必須のものであると考えられる。その理由は、平衡移動の速い典型的な系であるプルロニックから成る高分子ミセルでは、*in vivo*でのターゲティングの例がないことである。これに対し、筆者がターゲティングに用いた高分子ミセルシステムは得られぬ内核が固体性を有していて、その固体性からNMPスベクトルの情報の内核からは得られぬ内核を用いている。しかし、ターゲティングを最適化するためには、すなわち血中親水性を最適化するために静的および動的な安定性がどの程度の割合で重要かについては明らかにされていない。より広範な薬物、治療目的に対応するためには、血液中でのミセル構造安定性に及ぼす、静的および動的な側面の寄手を明らかにするという、基礎的なアプローチが求められると考えられる。

3.2 高分子ミセルキャリアの製剤としての特徴¹⁾

高分子ミセル薬物キャリアシステムの製剤学的な長所と短所を表1にまとめた。長所から説明を始める。

表1 高分子ミセルの薬物キャリアとしての特徴

長所
1. 10~100 nmの粒径が容易に得られる
2. 機能的な材料設計が容易
3. 低い毒性
4. 様々なタイプの薬物の封入が可能

短所
1. 比較的高度な高分子合成が必要
2. 薬物封入法が未発達

3.2.1 10~100 nmの粒径が容易に得られる

高分子の集合体である球状の高分子ミセルでは、その直径は10~100 nmの範囲内である。高分子ミセルとしてはこの範囲の粒径が得られることは当然のことであるが、一般的にこのナノサイズの範囲の微粒子を得ることは技術的に困難である。この範囲の粒径は、従来する固形がん組織へのターゲティングで有用な大きさである。さらに、高分子から成るために、体液中でキャリアの機能を果たすのに十分な時間ミセル構造を安定に保つことが可能である(前項で記した静的および動的な側面での安定構造)。

この粒径の高分子ミセルが薬物キャリアとして有用なのは以下の2つの理由による。その第一は、この粒径であると腎臓からの排出を逃れ、かつ肝臓・脾臓の細胞内皮系に捕捉されにくいために、血中親水性を高く保つことが可能である。その第二は、固形がん組織へのパッシブターゲティングの1つの方法であるEPR効果を利用できることである。がん組織では血管内皮の透過性は異常に充満していると同時に、リンパ系による排出が抑制されているために、ナノサイズのキャリアは本質的に固形がん部位に選択的に蓄積しやすい性質がある。この性質はEPR効果(Enhanced Permeability and Retention effect)と呼ばれ、1986年に前田、松村によって提唱された²⁾。EPR効果は、高分子ミセルに限らずに、リポソームや合成高分子の固形がんへのタ

注1) パッシブターゲティングとは、腫瘍主体の組織を脱わすに、腫瘍や境界線などの物理現象を通して、特定の部位への選択的透過を行うことである。

一ゲティングにも適用される。これらのキャリアの中で高分子ミセルは、このEPR効果を利用した疎水性の強い抗がん剤ターゲティングキャリアとして大変使われていると考えられる。なぜなら、EPR効果を示すためにはその大きさが5~200 nmであることが求められるとともに、その表面は親水的で荷電においては中性か弱く負に帯電していることが必要である。高分子ミセルの大きさはまさにEPR効果に適した範囲内であり、疎水性や正電荷の薬物を多量に封入しても親水性内核を親水性の外殻がとり囲んでいるので、表面物性は親水的であり、EPR効果発現のための条件を満たしているからである。

また、この小さな粒径であることは、容易にフィルターを通り過による減価操作を可能とし、製剤上の大きな利点となっている。

3.2.2 機能的な材料設計が容易

図1に示したように、ブロックポリマーのA鎖がミセル外殻を形成し、B鎖が内核を形成する。ミセル外殻はタンパク質や細胞などの生体成分と相互作用を通して体内動態・分布を決定する。一方、内核は薬物を封入し、機能的に到着した後の薬効発現を担う。すなわち、ブロックポリマーのそれぞれの鎖に各自の機能的な役割を与え、それを最適化するように化学構造を選択することができる。このように、機能的な設計の観点から見ると大きな利点となり、内核を構成する高分子鎖と外殻を構成する高分子鎖とに薬物キャリアシステムとして必要とされる機能を分割して付与することで、より高性能のシステムが達成可能となる。

3.2.3 低い毒性

まず、高分子ミセルの生体内毒性について詳細に説明されたわけではなく、4つの臨床試験^{14,15}が行われている現時点(2008年)までで、把握されている副作用がないという現状であるということとをまずお断りしておき、その上で、機能的な高分子ミセルの毒性の低さから説明させていただく。

図形がんなどを標的とするターゲティングでは、血液の循環性を高めることが有益な場合が多いが、そのためには腎臓のろ過作用によって排出されない充分な大きさである必要がある。この要件を満たしたキャリアシステムは一方において、生体外へ排出されないことによる長期に蓄積する毒性の懸念がある。もちろん、腎臓から排出されなくても肝臓から胆汁排泄を通過しての経路もあるのであるが、腎臓からの排泄が確保されていることは、現時点では重要なことと考えられている。通常の材料では、高い血液循環性と長期的な腎臓からの排出性を両立するには、材料を生体内分解性のもので作製する必要がある。一方、高分子ミセルは、高分子の集合によってミセル構造が構築されているので、血液循環性が必要な時間範囲ではミセル構造によって腎臓からの排出を免れ、長期的に見れば高分子ミセルは1本1本の高分子鎖に分解するため、生体に蓄積して毒性を及ぼす心配が概念上ないことになる。そのため設計としては、ミセルから溶解したプロテ

クポリマーの分子量を腎臓から排出されるように(約3万以下にする)することである。

次に、筆者が研究・開発に関与したシステムについての毒性について述べる。まず、マウスが人モデルを用いた評価では、最大耐量を基準に評価を行うため、非選択的に正常組織・臓器に分布した抗がん剤による副作用が顕著に起きている状態での評価であり、高分子ミセルキャリア自体の毒性を評価することは困難な場合が多い。また、実験動物で知ることのできる副作用はかなり限られている。このような限られた範囲の評価であっても、内包する抗がん剤が元々有している副作用と異なるタイプの副作用が見られるかは大切な事項である。これまでの検討ではそのような副作用は観察されることはなかった^{16,17}。

薬物ターゲティングの臨床では、キャリア自体、あるいはキャリアによるターゲティングの特性によって従来の抗がん剤にはない特有の副作用が報告されている。リポソーム製剤における hand and foot syndrome¹⁸であり、抗体製剤における infusion-related reaction¹⁹がよく知られた例である。これまでに明らかになった高分子ミセル抗がん剤の臨床報告では、キャリアシステム特有の副作用は観察されていない。

以上の結果を待って、「高分子ミセルキャリアには毒性はない」とか「抗がん剤を対象とした場合には全く問題はない」とするには、更なる基礎的・臨床的な検討の積み上げが必要である。しかし、少なからず行われた動物実験、臨床試験の中で毒性が認められないという事実は、毒性面から見た高分子ミセルの高いポテンシャルを示していると考えられる。

3.2.4 様々なタイプの薬物封入が可能

これまでは、疎水性のミセル内核に疎水性の低分子薬物を封入するタイプを中心に説明を行ってきた。薬物には疎水性部分を含むものが多いので、疎水性相互作用を利用することが最も適用範囲が広いのである。しかし、高分子ミセルを形成する性質(ミセル内核の集合を生み出す相互作用)は疎水性相互作用に限定されない。一般的には疎水性内核には限定されず、水素の活発中、内核でB鎖が集合を起こすような相互作用を起こせばミセル形成し得るということである。この相互作用としては上述の疎水性相互作用の他には、静電相互作用、水素結合などがある。静電相互作用、水素結合を利用すれば、DNAやタンパク質などの高分子をミセルに封入することに応用できる^{18,19}。また、金属錯体の抗がん剤であるシスプラチンを結合させた高分子ミセルシステム^{18,20}がある。結合させたシスプラチン自身、ある程度の疎水性を有するが、ミセル形成の中心的な役割を果たしているのが高分子鎖間の架橋構造であることが他の場合と異なっている。シスプラチン分子中心の白金イオンに複数の高分子鎖が配位結合して、高分子間に架橋構造が生ずることでもミセル内核が形成している。

次に高分子ミセルキャリアの短所と考えられる2つの事項を述べる。

3.2.5 比較的高分子ミセルキャリアの短所

典型的な高分子ミセルキャリアを合成するためには、合成高分子としては珍しい種類のブロックコポリマーが必要であり、ブロックコポリマーを合成する方法はそうでないポリマーを合成する方法よりも高い技術が必要とされる場合が多い。高分子合成はその単位であるモノマーと呼ばれる低分子化合物を連鎖的に結合して行く反応で得る。よって、図3に示すようにAのモノマーの重合（連鎖的結合反応）が終了した頃を見計らって、別の種類のモノマー-Bを加えれば容易にAB型のブロックコポリマーが得られると想像するのは自然なことである。しかし現実には、様々な副反応が起こり、目的とするAB型のブロックコポリマーはほとんど得られず、図3の下側に示したAやBのみから成るホモポリマーや、分岐した形のポリマーが生成してしまう。大部分の合成高分子の生産に用いられているラジカル重合法では、非常に特殊な触媒系を用いない限り、このような副反応は避け得ず、通常ブロックコポリマーを得る方法としては機能しない。アニオン重合法といった副反応が少くない方法でのみ、ブロックコポリマーは合成できる。また、どのモノマーもアニオン重合などブロックコポリマー合成に適する方法で重合するとは書えず、用いることのできるモノマー種類はある程度限定を受ける。

また、単に高分子ミセルを形成すれば必ず薬物キャリアとして有用というわけではなく、ブロックコポリマー化学構造にかなり左右されることも、高分子合成化学が重要であることを示している。逆に見ると、高分子合成化学の技術がない環境での高分子ミセルキャリア研究・開発が進行しにくいことであり、大きな進歩を得るためには短所であると考えられる。



図3 ブロックコポリマーの合成

3.2.6 薬物封入法が未発達

マイクロエマルジョンやリポソームなど研究と開発の歴史が長いキャリアシステムに比べて、新しい高分子ミセルでは、薬物を安定にかつ高効率でミセル内核に封入する方法^{22,23,24}についての

検討が未発達である。また、実験室でのスケールではうまく封入できて、それを臨床に向けてスケールに大きくする方法論も今後進歩させる必要を感じる。

3.3 高分子合成

高分子ミセルキャリアの設計・作製のための、高分子化学をここで詳述することはスペースの関係で不可能である。高分子化学の教科書を参照していただくより他ない。ただし、ここでは高分子ミセルキャリアのために最も基礎的かつ重要である2点を説明させていただく。

3.3.1 ブロックコポリマーを合成する意味

3.1項の「高分子ミセル薬物キャリアとは」にも解説したように、高分子ミセルを形成する高分子の形態はブロックコポリマーに固定されないが、現在までのすべての臨床開発、大部分の基礎研究はAB型あるいはABA型のブロックコポリマーを用いてなされている。前項3.2.5に記載したように、どのような高分子種の組み合わせでも自由にブロックコポリマーが合成できるわけではなく、合成できる種の種類の組み合わせとそれを得る方法（重合法）は限定される。また、ブロックコポリマー合成においてA鎖やB鎖のホモポリマーが不純物として混入する場合はある。水溶性のA鎖はミセル形成挙動に影響は少ないが、ミセル形成部分であるB鎖のホモポリマーはミセル形成挙動への影響が大きいので、なるべく除きたい不純物である。

3.3.2 分子量のそろったポリマーを合成すること

天然高分子であるタンパク質は、ある種類のものには1つの分子量しか存在しない。これに対して合成高分子の分子量には分布があり、その平均分子量と分布の広がり度合いで表現される。高分子ミセルとしての粒径などの物性を正確に得るためにも、また医薬品としての品質管理のためにも、この分子量分布は狭いものが求められる。この分子量分布の狭さ 広さは、重合の種類とモノマーの種類によって大きく左右される。よって高分子ミセルキャリアのためにはこの面でも好適な（分子量分布の狭い）高分子種が選択される。大部分の研究・開発システムではこの面で高分子として用いられているポリエチレングリコール（PEG）鎖は、分子量分布の最も狭い代表的な合成高分子である。また、筆者らがミセル内核構成高分子種として用いているポリアミン鎖も、PEGに次いで狭い分子量分布が得られる。

以上述べたように、高分子ミセルキャリアのために使用できる高分子種の種類は高分子合成の観点からの制限を受ける。ただし、最新の合成技術を用いれば、それ程多くの研究開発がなされていない現時点では、充分な種類の高分子種が選択される（つまり検討されていない高分子種の組み合わせは充分に使っていない）と書える。

3.4 高分子ミセルにおける製剤設計の諸要素

3.4.1 高分子鎖の長さ

AB型のブロックコポリマーから高分子ミセルを形成させるとき、そのミセル構造形成挙動を決める大きな要因は、高分子鎖の長さである。ここではA鎖を親水性のプロック、B鎖を疎水性プロックとして話を進めさせていただく。親水性A鎖が長く、疎水性B鎖が短い場合には、ブロックコポリマーが単独で水中に可溶化して、ミセル構造は形成しない。それよりもA鎖が短く(相対的には絶対的長さにおいて)、B鎖が長くなるミセル構造を形成するようになる。さらに、A鎖が短くB鎖が長くなる水に不溶の凝集となってしまう(ミセル構造よりもA鎖が短くB鎖が長い側に、ポリマーソーム構造²³⁾を形成する場合がある)。よって、ある範囲内にA鎖長とB鎖長があるときに、高分子ミセルが形成することになる。この鎖長の範囲は両高分子鎖の化学構造によって規定される。例えば、より疎水性の強いB鎖を用いた場合には、よりB鎖が短い範囲でミセルが形成される。

以上は、ミセル形成の物理化学では基本的なことであるが、薬物キャリアとしてはそのミセル形成範囲内では、高分子としてどのような構造のものを用いるのが好ましいのであろうか? 結論から申し上げるとこの点の解明は行われていないのが現状である。しかし、いくつかわかっていることがある。

高分子鎖の長さを変えたときに変化する高分子ミセルの基本的物性は、臨界ミセル濃度(CMC)と粒径である。ミセル構造を形成する高分子鎖の範囲内で、疎水性の高分子鎖を長くすると、CMCは小さくなる。また、粒径は一般的には大きくなる。この粒径増大は、疎水性部分が大きくなったことにより、主に1鎖のミセルを構成する会合ポリマー数が増大するためである。前項3.1で説明した通り、血液中のアルブミン²⁴⁾におけるCMCの重要性が解明されていないため、ブロックコポリマー組成を変えたときに、CMCと粒径の両方が変化して、薬物動態への影響が解析できないことが大きな理由である。しかしながら、いくつかの有益な情報は得られている。

筆者らが行った抗がん剤アドリマイシンを内包させた高分子ミセル²⁵⁾では、親水性(外殻になる)のポリエチレングリコール鎖が長く、疎水性になるポリアミノ酸誘導体の短いものが高い抗がん活性を示した。この例では、疎水性鎖はポリアスパラギン酸に疎水性の抗がん剤アドリマイシンを化学結合させたことにより得られている。よって、アスパラギン酸誘導体のどのくらいの割合にアドリマイシンを結合させるかで、ポリアミノ酸誘導体鎖の疎水性の強さは変わってくる。このアドリマイシンの高分子ミセルでは、かなりの長さの範囲でミセル構造を形成させるために、結合率を変えて高分子を得ている。このように高分子鎖長の正確な比較にはなっていない

注2) ポリマーソームとは、鎖長から成るポリソームのように高分子でベシクル構造となるもの。

いのであるが、興味あるのは最も高い*in vivo* 抗がん活性を示したのは最も親水性PEG鎖が長く、疎水性鎖が最も短いものであった。そのうちの代表的な組成の体内動態を比べてみると、最も抗がん活性の高かった組成が最も長い血中半減期と、高いがん集積性を示していた。このことは、血中親水性の高い組成のミセルが、最も効率よくEPR効果に基づいたがんターゲットリングを実現できるので、高い抗がん活性を示すことが可能となることを示す。高分子ミセル形成高分子の鎖長がどのような要因で、高い血中親水性を示すようになるかについての考察は3.4.4において行う。

3.4.2 ミセル内核形成高分子鎖の化学構造

疎水性の薬物を封入するため、水溶液でミセル形成するために、ミセル形成高分子B鎖は疎水性であることはもちろんであるが、単に疎水性がミセル形成と薬物封入に足るのに充分であれば、ターゲットリングが達成できるわけではないことがはっきりしている。

抗がん活性物質カンプトテチン封入高分子ミセル^{26,27)}では、ミセルを形成する高分子鎖が中間的な疎水性のときに特異的に高い血中親水性を示した。カンプトテチンはほとんど水に溶解しない疎水性の化合物であるので、疎水性相互作用が主たる薬物封入の相互作用であることは自明であり、ある程度範囲の疎水性を有する高分子鎖のミセルへの封入は比較的容易であった。にもかかわらず、特定の疎水性のもののみ高い血中親水性を示した事実は、溶液中の高い血中親性を得るためには、それ以外の因子が封入には必要であることを意味する。その因子として第一に考えられるのは、高分子鎖に薬物がよくからみつくような立体的なスペースが高分子構造にあることである。しかし、結晶でもないこのような立体的な因子を解析することは困難である。

アドリマイシンを封入して固形がんへのターゲットリングに成功した組成²⁸⁾においても、上記で述べた立体的な要因が好適に達成された組成である可能性がある。アドリマイシンの場合はそれに加えて、アドリマイシン分子間で相互作用して非共有結合的な量体構造が作りやすいことが知られている。この薬物封入は高分子鎖に化学結合したアドリマイシン分子に、他のアドリマイシン分子が物理的に吸着することによっている。単に水分子と接することを嫌う分子同士が集まる疎水性相互作用のみではなく、分子同士が特異的にも着る親和性を有していることが、アドリマイシンのシステムでは有効に作用している可能性がある。

ある化学構造の親水性薬物を高分子ミセルに封入してターゲットリングしようとしたとき、薬物封入が可能な高分子組成を見つけることは容易であるが、高い血中親水性を示すように安定に薬物を封入できる高分子組成を見つけることは容易でない。高分子ミセル薬物キャリア研究の最重要部分は封入安定性を高める高分子組成を見つけることにあると書いてはならない。このように、任意の薬物封入を最適化できる高分子を容易に見つけるための方法論を構築することが大切である。そのためには、基礎的な高分子化学、物理化学、分析化学にまで範囲を広げた研究が

必要であると考えられる。

3.4.3 封入薬物量

ミセルを形成する高分子鎖が固定された場合、それに封入する薬物量はターゲティング性能に影響するのであるだろうか？ これについては影響する場合と、影響しない場合が知られている。

まず、封入薬物量がターゲティングに影響するアドリアマイシン封入ミセルの例を紹介する。この例では、ブロックコポリマーを固定して、物理的に封入するアドリアマイシンの量を変えて、抗がん活性および体内動態を比較している。この物理的封入薬物量が多い方が、血中循環性が高くなり、より固形がんにも集積し、抗がん活性もより高い。この事実を、封入薬物がミセル内核の環境をより親水にする一方で、薬物の封入安定性が向上したと考えられる。このアドリアマイシンの場合には、*intact*なアドリアマイシンよりも親水性の高いアドリアマイシン2量体が形成してミセルに封入されているという、特殊な事実があるが、この2量体がミセル内核の親水性を高めることは事実である。

一方、カンブチチン封入ミセルではその封入量をブロックコポリマーに対して5~40%の重量割合にした範囲では、薬物の血中循環性には変化が見られない¹⁹⁾。薬物封入の安定性は親水性高分子鎖と薬物間の相互作用によって決まり、薬物封入に伴う内核の環境変化は影響しない状態のように考えられる。

以上のように、封入薬物量に関しては対照的な場合があることが知られているが、どのような化学的要因によって、どちらになるかについては不明である。しかし、少なくとも薬物封入量はターゲティングを決定する重要な要因になる可能性があり、検討すべき因子であることは確かである。

3.4.4 ターゲティング性能と高分子ミセルの物理化学性との関係

上記の3.4.1~3.4.3では高分子ミセルキャリアシステムの化学組成を決める要因について述べてきた。これらの化学組成は図4に示すように、体内でのミセル経路、構造安定性、表面物性、薬物放出速度によって体内動態・分布が決定されていると考えられる。このうち構造安定性は様々な要素を含む。3.1の「高分子ミセル薬物キャリアとは」の項で述べたように、動的および静的なミセル構造安定性が影響し得る。また、生体では構造的に安定でも、肝臓や脾臓などの細胞内皮系に捕捉されることで血中濃度が急速に低下して、望むターゲティングは達成できない。

図4の化学構造、ミセル物性、ターゲティング性能の関連を解析し、よりききターゲティング性能を得る道筋を見つけていることが、高分子ミセルによるターゲティング研究・開発の核心部分と書える。これらの道筋はよくわかっていることが多い状況であるが、その中で、明らかにした道筋が1つある。それは、水素ゲル化/エーシオンクロマトグラフィー(GPC)での封入薬物



図4 高分子ミセル薬物キャリアシステムの設計

の測定である。水系のGPCでは親水性の薬物は、水に溶解しないために測定できないが、もし多少の水溶性を示すことでカラムに注入できて、カラムとの疎水性相互作用のために吸着して検出されないが、非常に遅く流出する。一方、高分子ミセルはその分子量が数百倍に対応する大きさであり、通常カラムの排除体積に(つまり一番早い流出時間で)流出する。また、高分子ミセルが真のカラムの排除体積に流出するのは、カラムとの疎水性相互作用が全くない場合である。以上の事柄を総合すると、封入薬物が早い流出時間で大きなピークで流出するほど、ミセルへの封入は安定であり、ミセルも疎水性相互作用を及ぼすことが少ないと書える。

これまでに、水系のGPCで評価した*in vitro*のミセルとしての優劣(薬物封入高分子ミセルのピークが早くて大きい程よいとする)が、*in vivo*での血中循環性、がん集積性、および抗がん活性の優劣と一致する例²⁰⁾が複数知られている。逆に、この関係から外れた例は経験した高分子ミセルシステムではなかった。このことは、高分子ミセルによるパッシブターゲティングにおいては、内包する薬物に起因する疎水性相互作用をいかに完璧にミセル内核に封じ込めて、タンパク質や新成性細胞との相互作用を抑制することが第一に重要であるかということを示唆する。

3.5 おわりに

本稿では、高分子ミセル薬物キャリアの製剤設計各要素についてまとめた。本キャリアシステムは、製剤設計において水溶性高分子、リポソームなどの他のキャリアシステムとは大きく異なる面があることを述べた。また、比較的に高度な高分子合成が必要なことなど、急速な発展を阻害する要因についても述べた。それにもかかわらず、ターゲティングで果たし得る大きな可能性を考慮すれば、技術的な困難を克服して研究・開発する価値のあるキャリアシステムであると思える。

- 1) M.Yokoyama, "Nanoparticles for Pharmaceutical Applications", p.63, American Scientific Publishers (2007)
- 2) M.Yokoyama, "Drug and Pharmaceutical Sciences, vol.148, Polymeric Drug Delivery Systems", p.553, Taylor & Francis (2005)
- 3) H. M. Alibadi and A. Lavasanifar, *Expert Opin on Drug Delivery*, 3, 139 (2006)
- 4) Y. Geog *et al.*, *Nature Nanotechnology*, 2, 249 (2007)
- 5) M. Wilhelm *et al.*, *Macromolecules*, 24, 1033 (1991)
- 6) Y. Matsumura and H. Maeda, *Cancer Res.*, 46, 6387 (1986)
- 7) H. Maeda *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3, 351 (1992)
- 8) 横山晶華, ナノ粒子とドラッグターゲットング, 機能材料, 22, 22-27 (2002)
- 9) Y. Matsumura *et al.*, *Br. J. Cancer*, 91, 1775 (2004)
- 10) T. Hamaguchi *et al.*, *Br. J. Cancer*, 97, 170 (2007)
- 11) 香口晋弥, 血液・腫瘍科, 54, 702 (2007)
- 12) T. Hamaguchi *et al.*, *British J Cancer*, 92, 1240 (2005)
- 13) M. Yokoyama *et al.*, *Cancer Res.*, 50, 1693 (1990)
- 14) M. Yokoyama *et al.*, *Cancer Res.*, 51, 3229 (1991)
- 15) M. Yokoyama *et al.*, *Drug Delivery*, 1, 11 (1993)
- 16) M. Yokoyama *et al.*, *J. Drug Targeting*, 7, 171 (1999)
- 17) E. Katsola *et al.*, *Macromolecules*, 29, 8556 (1996)
- 18) A. Harada *et al.*, *Macromolecules*, 31, 283 (1998)
- 19) M. Yokoyama *et al.*, *J. Controlled Release*, 39, 351 (1996)
- 20) H. Uchino *et al.*, *Br. J. Cancer*, 93, 678 (2005)
- 21) T. Yamamoto *et al.*, *J. Controlled Release*, 123, 11-18 (2007)
- 22) G. S. Kwon *et al.*, *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 2, 429 (1994)
- 23) M. Yokoyama *et al.*, *J. Controlled Release*, 32, 269 (1994)
- 24) M. Yokoyama *et al.*, *J. Drug Targeting*, 12, 373 (2004)
- 25) M. Watanabe *et al.*, *International J. of Pharmaceutics*, 308, 185 (2006)
- 26) K. Kawano *et al.*, *J. Controlled Release*, 112, 329 (2006)
- 27) M. Yokoyama *et al.*, *J. Controlled Release*, 28, 59 (1994)
- 28) M. Yokoyama *et al.*, *J. Controlled Release*, 50, 79 (1998)

機能性DDSキャリアの製剤設計

2008年10月10日 第1刷発行

監修 岡田弘亮 (T0842)
 発行者 辻 賢司
 発行所 株式会社シーエムシー出版
 東京都千代田区内神田1-13-1 (丸の内ビル)
 電話 03 (3293) 2061
 大阪市中央区南新町1-9-4 (錦本ビル)
 電話 06 (4794) 8234
<http://www.cmcbooks.co.jp/>

[印刷 株式会社建文社]

©H. Okada, 2008

定価はカバーに表示してあります。
 落丁・乱丁本はお取替えいたします。

本書の内容の一部あるいは全部を無断で複製(コピー)することは
 法律で認められた例外を除き、著作権および出版社の権利の侵害に
 なります。

ISBN978-4-7813-0052-8 C3047 ¥65000E

Demonstration and Partial Identification of Aberrant Muc1 Bearing Tn Antigen in Rat Ascites Hepatoma AH109A Cells with Strong Lymph Node Metastasis Propensity

*Takanori Kawaguchi^{*1,5}, Shunsuke Imai², Satomi Haga³,
Jyunji Morimoto⁴ and Takashi Honda⁵*

¹Department of Pathology, Aizu Central Hospital, Aizu Wakamatsu 965-8611

²Division of Pathology, Nara City Hospital, Nara 630-8305, Japan

³Nara Prefectural Institute of Public Health, Nara 630-8131, Japan

⁴Experimental Animal Center, Osaka Medical College, Osaka 569-8686, Japan

⁵Division of Human Life Sciences, Fukushima Medical University School of Nursing,
Fukushima 960-1295, Japan

Abstract

Lymphatic metastasis is a crucial property of malignant tumors, but little is known about the molecular mechanism associated with this feature. We recently discovered an aberrant MUC1 of ~33 kDa bearing *Vicia villosa agglutinin* (VVA)-binding carbohydrate(s) (Tn antigen). Expression of the MUC1 protein in cancer cells had a significant relation to lymph node metastasis in patients with breast cancer (Current Drug Targets, 2005; Breast Cancer Res Treat, 2006). At present, we are investigating aberrant MUC1 bearing Tn antigen of rat ascites hepatoma AH109A cells (poorly differentiated hepatocellular carcinoma) with strong lymphatic metastasis propensity. These cells metastasized to lymph nodes 2 to 3 weeks after the inoculation into subcutaneous tissue of abdominal wall when intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) appeared in

* Address correspondence to Dr. Takanori Kawaguchi at the Division of Human Life Sciences, Fukushima Medical University School of Nursing, 1 Hikariga-oka, Fukushima 960-1295, Japan; Tel: +81-24-548-7151; e-mail: tkawa@fmu.ac.jp

malignancy of various kinds of cancers [9-13]. Alternation of MUC1 localization in the cells is severely related to metastatic propensity of cancer cells [14, 15]. We have demonstrated that lack of heterozygosity of MUC1 protein of primary breast cancer cells is related to lymph node metastasis status of the patients [16]. More recent our studies demonstrated a relationship between expression of low molecular aberrant MUC1 proteins of primary breast cancer cells and lymph node metastasis status of the patients [17, 18]. Among MUC1s with varying molecular weights, ~33 kDa MUC1 protein was considered to be most relevant to lymphatic metastasis. We were also interested in unique carbohydrate(s) bore with the ~33 kDa MUC1, which binds to *Vicia villosa* agglutinin (lectin) (VVA). VVA is known to be a lectin, which binds specific to *N*-acetylgalactosamine, especially strong to Tn antigen [19, 20].

Through considerations of literatures and our own researches, we think that animal tumor model is necessary to elucidate the role of MUC1 of cancer cells on metastasis. Regretfully, little information on MUC1 has been provided in experimental animal tumors, although some xenograft models contribute to understanding of metastasis [21, 22]. In the present paper we investigate MUC1 of rat ascites hepatoma AH109A cells, which metastasize preferentially to lymph nodes.

Materials and Methods

Animal and Tumor

Four- to six-week old rats (60 to 80 g) were purchased from Chares River (Tokyo, Japan). Rats were maintained under water *ad libitum* and were used for the experiments. Experiments were carried out under the control of the Animal Research Committee in accordance with the Guidelines on Animal Experiments in Fukushima Medical College and Japanese Government Animal Protection and Management Law.

Rat ascites hepatoma AH109A was used. This is an ascites form cell line of poorly differentiated hepatocellular carcinoma, syngeneic to Donryu strain rat, and has been cryopreserved in our laboratory [23]. The cell line usually was maintained by intraperitoneal (ip) transplantation during experiments. On the 7 day after inoculation, ascites was obtained and washed several times with physiological saline solution (PB) to remove erythrocytes. It was confirmed by trypan blue exclusion test that more over 90% of tumor cells were alive. A tumor cell suspension (2.0×10^6 cells in 0.2 ml of PB) was used to experiments. All animals used were autopsied at the time of death or at 3 months after the inoculation.

Histology and Immunohistochemistry

Histological materials were fixed ordinary in 10% formalin containing 4% methanol. Fixations using 4% paraformaldehyde or zinc (Zinc Fixative, formalin-free; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) under the condition of whole body circulation were also carried out in some cases. Materials were embedded in paraffin and sections with 3 μ m thickness were made. These thin sections were placed onto glass slides, deparaffined in

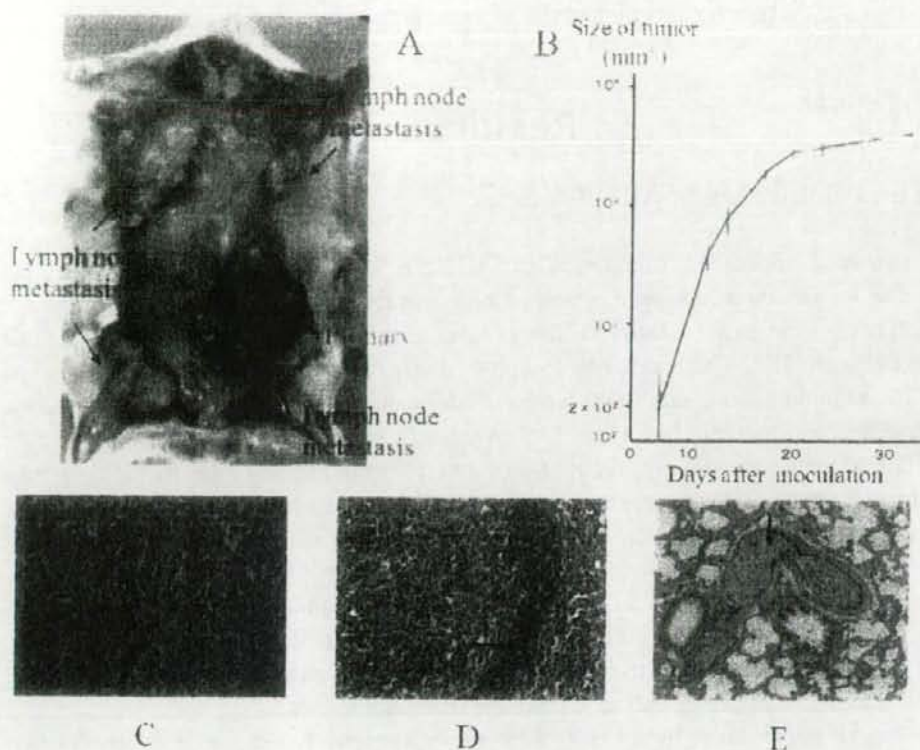


Figure 1. Morphological appearance and growth curve of AH109A tumors. A: Primary lesion in sc tissue of abdominal wall and its metastasis in lymph nodes of axillary, inguinal and neck regions. B: Growth curve of AH109A tumor inoculated sc. An average value with standard deviation of 8 animals was indicated. C, D, and E: Histological appearances of AH109A cells in primary sc tumor, lymph node, and lung, respectively. Arrow heads of D and E indicate lymphocytic infiltration around tumor cells and tumor cells in pulmonary artery, respectively. Original magnifications for C, D and E are $\times 400$, $\times 200$ and $\times 200$, respectively.

The homogenized suspensions were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min to remove the crude sediments and supernatants were shaken gently at 4°C overnight. The solutions were dialyzed against 10 mM PB at 4°C overnight and protein fractions were salting-out by ammonium sulfate (Wako, Osaka, Japan). The sediment protein was harvested by centrifugation (10,000 rpm, 15 min), and were concentrated using a molecular size cut-off membrane filter of 10 kDa (Ultracent-10 Tosoh, Tokyo, Japan or VIVASAPINAE 20, VIVASCIENCE, Hannover, Germany), to a concentration of 5mg/1ml PB. The protein concentration was measured by using a BCA Proteins Assay kit (Pierce, Rockford, IL). The suspension was passed through a Blue sepharose column (Seikagaku Industry Co., Tokyo Japan) to remove serum albumin. After concentrated, the specimens were stored at a -80°C deep freezer.

Submandibular glands of adult female rats were homogenized in an earthenware mortar and the homogenized materials were treated as described above.

temperature, followed by incubation at 4°C overnight with gently shaking. The solution was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min and the supernatant was used for staining.

Results

Growth and Metastasis of AH109A Cells

We examined metastatic preference of AH109A cells by injecting the cells into subcutaneous (sc) tissue of abdominal wall of rats, and the results were shown in Figure 1. The tumor cells grew exponentially in the rats resulting in death until 65 days after the inoculation [Figure 1B]. These rats had lymph node metastases in axillary and/or inguinal regions. In addition, some rats had lymph node metastasis in the neck, paratrachea, retroperitoneum, and mesenterium [Fig. 1A]. When sc tumors were resected at 1 week after the inoculation, metastasis did not occur at all (none of 4 rats) in any sites including lymph nodes, whereas lymph node metastases occurred in all animals (4 of 4 rats) examined when tumors were resected at 3 weeks after the inoculation. When primary tumors were resected at 2 weeks after sc inoculation, lymph node metastasis occurred in 2 of 4 rats examined. Microscopically, tumor cells grew in sc tissues accompanying abundant blood vessels within 1 week after the inoculation (Figure 1C), and thereafter drastic changes occurred in the stroma of tumors and peritumoral tissues, such as extensive necrosis, sinusoidal vasculatures, fibroblastic and myofibroblastic cell proliferations (data, not shown).

Intravascular migration of tumor cells were easily detected 3 weeks after the inoculation and metastatic tumors were detected in lymph nodes and the lungs of all animals died with tumors. Tumor cells were found to grow well in lymph nodes and formed solid tumors [Figure 1D], while metastatic tumors in the lung, except for 2 animals, were very small and frequently localized in pulmonary arteries [Figure 1E]. Adrenal gland metastasis was found in 2 of 10 rats died with tumors, but no tumor metastasis was found in any other organs, such as brain, heart, liver, kidney, muscle, bone, and others.

Intravenous injection of the cells (2×10^6) into rat (8 rats) did not produce metastatic nodules in any organs including the lungs until 3 weeks after the injection when these rats were sacrificed at this time.

Immunohistochemical and Lectin Histochemical Expression of MUC1, Vicia Viosa Agglutinin (VVA)-Binding Carbohydrates, and Intercellular Adhesion Molecule 1(ICAM-1)

Three kinds of MUC1 antibodies (C-20, H-295, and N-19) displayed differential immunostaining of AH109A tumor cells grown in sc tissues. C-20 antibody-positive staining was found in the cytoplasm of tumor cells as diffuse fine granules [Figure 2A]. On the other hand, C-20 antibody stained large droplets in tumor cell cytoplasm, which appeared mainly in the late stage of tumor growth [Figure 2C].

The tumor cells, which contained these droplets, resembled signet-ring cell carcinoma of human origin. H295-positive substances usually appeared to be deposits in the cytoplasm of tumor cells [Figure 2B], while in some areas these substances appeared to be membranous on tumor cell surfaces. We examined H-295-immunostaining on normal liver and salivary gland. It was clearly demonstrated that this antibody did not react with hepatocytes at all, while the antibody reacted strong with apical site of intrahepatic bile duct [Figure 2D]. Positive H-295 sign for salivary glands was found mainly secretory products in the lumen [Figure 2E]. Positive ICAM1-staining was found selectively in vascular endothelial cells, which appeared in 2-week-old sc tumors, but the positive sign was not found in vascular endothelial cells around 1-week-old sc tumor [Figure 3]. VVA from E.Y. Laboratories and VVA-B₁ from Sigma stained intensely the cytoplasm of tumor cells [Figure 4].

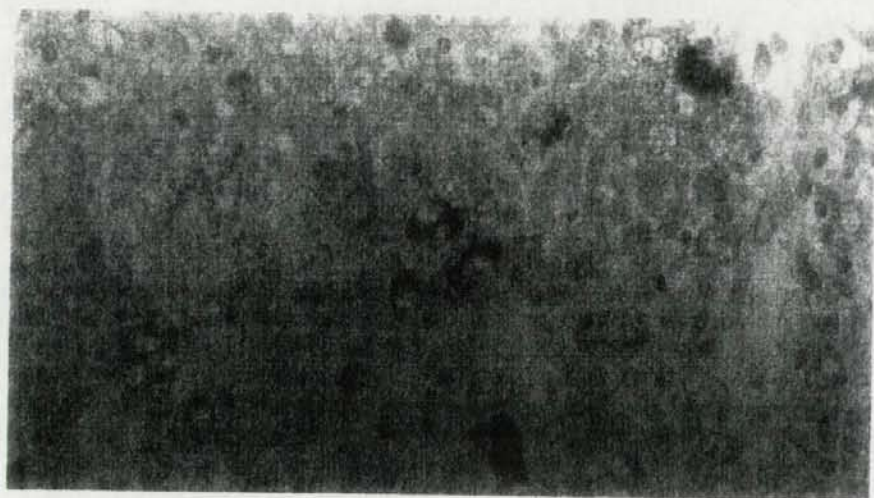


Figure 4. Expression of *Vicia villosa* agglutinin (VVA)-binding carbohydrate(s). VVA labeled with digoxigenin (DIG) was detected by mouse anti-DIG monoclonal antibody (Roche). $\times 400$.

Western Blotting Profiles of Proteins Obtained from VVA Affinity Chromatography and PNA Affinity Chromatography

Since Western blot analysis on sc tumors and metastatic tumors in lymph nodes did not demonstrate clearly H-295 anti-MUC1- positive bands, we analyzed materials from VVA affinity chromatography and PNA affinity chromatography.

The elution pattern of AH109A cell lysates from sc tumors via VVA affinity chromatography was shown in Figure 5A. The sample prepared with non-reducing and denaturing condition made major H-295 reactive bands of ~ 40 kDa, followed by 20 kDa and ~ 221 kDa [Figure 5B]. On the other hand, the sample prepared with reducing and denaturing condition made H295-reactive bands of ~ 20 , ~ 30 , ~ 33 , and 35 kDa [Figure 5C]. The proteins from VVA affinity chromatography were too little to study the profile of these proteins. Since it is well known that PNA binds to MUC1 [See Ref 16, 18], we carried out

This showed clearly that much amounts of proteins were eluted by this procedure. So, we carried out further studies on the MUC1 obtained by PNA affinity chromatography. The results were shown in Figure 7B, demonstrating that major H295-positive molecules were located at ~30, 33-35 and ~40 kDa on sc primary tumor, and ~30, ~33-35, 40, and 50-70 kDa on metastatic tumors from lymph nodes.

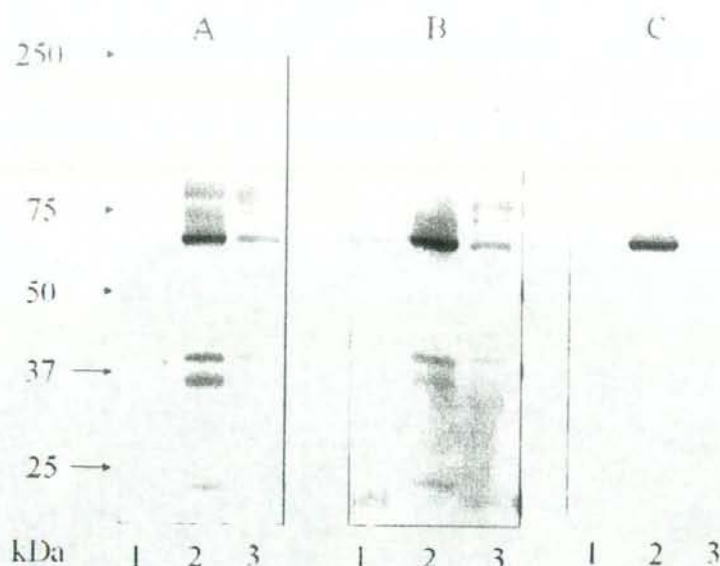


Figure 7. Hapten inhibition of *Vicia villosa* agglutinin-binding protein of AH109A cells by N-acetylgalactosamine and Tn antigen. A, B, and C indicate the solutions which were preincubated with 10 mM PBS, 100 mM N-acetylgalactosamine (GalNAc), or 1 mM Tn antigen (GalNAc-O-Ser/Thr), respectively. Lane 1, 2 and 3 indicate submandibular gland mucin, lymph node metastasis, and primary sc tumor, respectively.

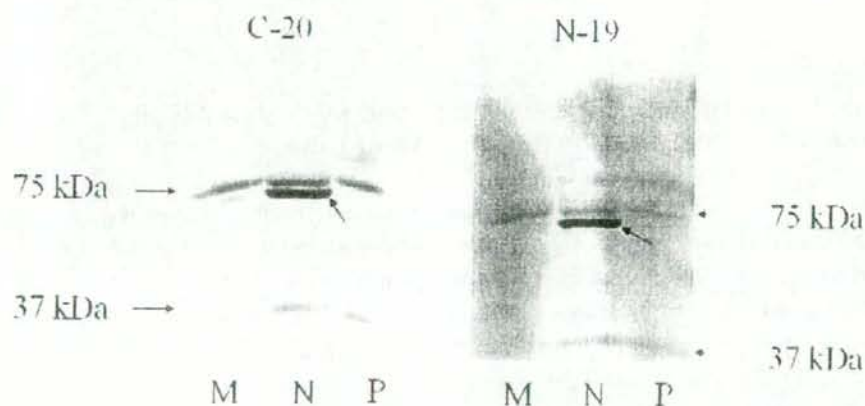


Figure 8. Western blotting profiles of C-19 and N-20-reactive proteins of AH109A cells. M, N, and P indicate submaxillary gland mucin, metastatic tumor in lymph node, and primary tumor, respectively. About 70 kDa bands indicated by an arrow head are intrinsic alkaline phosphatase derived from lymph nodes.

contains SEA module [4, 29, 30]. It is reported that the primary cleavage site of MUC1 is SEA module as FRPG/SVVV a sequence that is highly conserved in a number of heavily glycosylated mucin-like proteins [30]. It is possible to consider, therefore, that aberrant MUC1 proteins of 30–40 kDa from rat ascites hepatoma AH109A cells involve SEA module, although precise amino acid sequences of the MUC1 proteins must await further studies. This possibility suggests that aberrant MUC1 proteins of 30–40 kDa are produced not only by splicing but also by proteolysis of MUC1 proteins at SEA module.

Another important problem is of glycosylation of MUC1 proteins of 30–40 kDa. It is well known that MUC1 bears mainly O-glycosylated carbohydrates [4]. This is because VNTR domain is heavily O-glycosylated. Aberrant MUC1 proteins of 30–40 kDa bear VVA-reactive carbohydrate(s) and we have considered the carbohydrate(s) being O-glycosylated, because the VVA-reactivity was absorbed clearly by pre-incubation with Tn antigen (GalNAc-O-Ser/Thr) as seen in the previous paper [18] and in the present paper. However, there remains a possibility that the aberrant MUC1 proteins bear N-type carbohydrate(s), because VVA have strong adhesion affinity to proteins with N-type carbohydrates such as transferrin [26]. If the aberrant MUC1 proteins of 30–40 kDa involved VNTR and extracellular sequence of C-terminal subunit, it may be possible that these proteins have either O-glycosylated or N-glycosylated carbohydrates.

In any way, it is certain that MUC1 protein of rat ascites hepatoma is deviated from normal one in terms of distribution in the cells and protein composition. This can be seen in MUC1 proteins which react with C-20- and N-19-antibodies. Distribution of C-20-positive fine granular deposits in the cells [Figure 2A] is familiar in many papers that were recently reported, and N-19-reactive droplets in the cells (Fig. 2C) are reasonable feature of MUC1 accumulation in cells, although the feature was rarely reported. However, striking feature was given by Western blotting as shown in Figure 8 in which electrophoresis patterns by C-20-antibody and N-19 antibody were extremely resembled. At present, we do not know the reason.

As demonstrated by several previous workers, there is a distinct relationship between atypical expression of MUC1 of carcinoma cells and poor outcome of patients with hepatocellular carcinoma [13, 31]. Regrettably, no one knows how MUC1 of hepatocellular carcinoma cells is concerned with their malignant nature. We do not study this problem in detail, but we think that MUC1 of AH109A cells is involved in their lymph node metastasis formation in following two events in a metastatic process; intravasation and growth. The former is derived from the fact that AH109A sc tumor metastasized to lymph nodes 2 weeks after the inoculation when ICAM-1 was expressed in vascular endothelial cells around the tumors. Since it is well-known fact that MUC1 molecule is able to bind to ICAM-1 [32, 33], the interaction may lead AH109 cells to successful intravasation of tumor cells. The latter is that MUC1 of AH109A cells may be involved in the mechanism by which the cells escape from lymphocytic attack [34–36]. An example can be seen in Figure 1D, where lymphocytes seem to be unable to infiltrate in tumor cell clusters. In this aspect, we are interested in difference of Tn antigen expression in MUC1 proteins of 30–40 kDa, between primary sc tumors and metastatic tumors in the lymph nodes [Figure 8]. Since Tn antigens are immunoreactive [37–39], the difference of Tn antigen expression between primary sc tumor and lymph node-metastatic tumor supports the hypothesis that tumor cells acquire metastatic nature by changing the carbohydrates of proteins and/or lipids of cells. Our recent publication

- [13] Ichikawa T, Yamamoto T, Uenishi T, Tanaka H, Takemura S, Ogawa M, Tanaka S, Suehiro S, Hirohashi K, Kubo S. Clinicopathological implications of immunohistochemically demonstrated mucin core protein expression in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, 2006, 13: 245-251.
- [14] Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, Hugh JC. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 2001, 91:1973-1982.
- [15] Nassar H, Pansare V, Zhang H, Che M, Sakr W, Ali-Fehmi R, Grgnon D, Sarker F, Cheng J, Adsay V. Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein. *Modern Pathol.*, 2004, 17: 1045-1050.
- [16] Kawaguchi T, Takazawa H, Imai S, Morimoto J, Watanabe T. Lack of polymorphism in MUC1 tandem repeats in cancer cells is related to breast cancer progression in Japanese women. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2005, 92: 223-230.
- [17] Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates. *Current Drug Targets- Cardiovascular and Haematological Disorders*, 2005, 5: 39-64.
- [18] Kawaguchi T, Takazawa H, Imai S, Morimoto J, Watanabe T, Kanno M, Igarashi S. Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA? *Breast Cancer Res. Treat.*, 2006, 98: 31-43.
- [19] Tollefsen S, Kornfeld R. The B4 lectin from Vicia villosa seeds interacts with N-acetylgalactosamine residues α -linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258:5172-5176.
- [20] Osinaga E, Tello D, Batthyany C, Bianchet M, Tavares G, Duran R, Cervenansky C, Camoin L, Roseto A, Alzari PM. Amino acid sequence and three-dimensional structure of the Tn-specific isolectin B4 from Vicia villosa. *FEBS Lett.*, 1997, 412:190-196.
- [21] Alpaugh ML, Tomlinson JS, Shao Z-M, Barsky SH. A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. *Cancer Res.*, 1999, 59:5079-5084.
- [22] Jan YY, Yeh TS, Yeh JN, Yang HR, Chen M-F. Expression of epidermal growth factor receptor, apomucin, matrix metalloproteinases, and p53 in rat and human. Appraisal of an animal model of cholangiocarcinoma. *Ann. Surg.*, 2004, 240: 89-94.
- [23] Odashima S. Establishment of ascites hepatomas in the rat, 1951-1962, In: Editor Yoshida T, Ascites Tumors-Yoshida Sarcoma and Ascites Hepatoma(s), *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 16, Maryland, USA, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, 1964, 51-93.
- [24] Matsushita Y., Yamamoto N, Shirahama H, Tanaka S, Yonezawa S, Yamori T, Irimura T, Sato E. Expression of sulfomucins in normal mucosae, colorectal adenocarcinomas, and metastases. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1995, 86: 1060-1067.
- [25] Hasegawa H, Kano M, Hoshi N, Watanabe K, Satoh E, Nakayama B, Suzuki T. An electrochemotherapy model for rat tongue carcinoma. *J. Oral. Pathol. Med.*, 1998, 27: 249-254.
- [26] Kawaguchi T. Vicia villosa agglutinin (lectin)-binding carbohydrate(s) is expressed in atypical MUC1, serotransferrin and immunoglobulin of rat ascites hepatoma AH109A cells with lymphatic metastasis propensity. *AACR Annual Meeting Proceedings*, 2005, 46:52.

-
- [41] Sleeman JP: The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. In: Schlag PM, Veronesi U, *Recent Results in Cancer Research* 157, Berlin Springer-Verlag, 2000, 55-81.



Pharmaceutical Nanotechnology

Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability

Masato Watanabe^a, Kumi Kawano^a, Masayuki Yokoyama^b,
Praneet Opanasopit^c, Teruo Okano^c, Yoshie Maitani^{a,*}

^a Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University, Ebara 2-4-41, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

^b Kanagawa Academy of Science and Technology, KSP Bldg. East 404, Sakado 3-2-1, Takatu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken, 213-0012, Japan

^c Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Kawada-cho 8-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

Received 7 July 2005; received in revised form 7 October 2005; accepted 24 October 2005

Available online 29 November 2005

Abstract

To improve its aqueous solubility and stability in biological fluid, CPT was physically loaded in polymeric micelles. Polymeric micelles were composed of various poly(ethylene glycol)–poly(aspartate ester) block copolymers (PEG-P(Asp(R))). The incorporation and circulation stability of CPT micelles were evaluated by measuring the CPT in micelle using gel-permeation chromatography and by CPT concentration measurement after intravenous injection using HPLC, respectively, in terms of chemical structure of block copolymers. The stability of CPT-loaded micelles in vivo depended on the amount of benzyl esters, and length of PEG in the polymers to a greater degree than it did in vitro. A stable formulation of CPT-loaded micelles was obtained using PEG-P(Asp) with PEG of 5000 (MW), 27 Asp units, and 57–75% benzyl esterification of Asp residue. This CPT-loaded micelles showed about a 17-fold lower blood clearance value than unstable micelles. The CPT-loaded micelles are potentially delivered to tumor sites owing to an extended circulation in the blood stream.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Camptothecin; Polymeric micelles; Long circulating; In vivo stability

1. Introduction

Camptothecin (CPT) is a naturally occurring cytotoxic alkaloid isolated from the Chinese plant *Camptotheca acuminata* (Wall et al., 1966). CPT and some of its analogs have shown a broad spectrum of antitumor activity against many solid tumors in xenografts (Giovanella et al., 1989, 1991). CPT inhibits the enzyme DNA topoisomerase I, initially by noncovalent binding and subsequently by stabilization of the complex through a nucleophilic attack by the enzyme at the acyl position of the CPT lactone ring (Hertzberg et al., 1989). In early clinical trials, CPT was formulated as a water-soluble CPT-Na⁺ (Moertel et al., 1972). However, it was later reported that the lactone E-ring is important for cytotoxicity and that the open-ring carboxylated

CPT-Na⁺ is inactive. The lactone of CPT is converted to carboxylate in a pH-dependent equilibrium (Fig. 1) (Fassberg and Stella, 1992). To overcome the solubility and stability problems of CPT, several approaches have been investigated. Water-soluble CPT analogs have been prepared but the majority of them were less potent in assays both in vitro and in vivo than the parent drug (Wall and Wani, 1995). Therefore, the development of adequate drug carriers is gaining increasing attention. These include methods such as conjugation to polymers (Zamai et al., 2003; Singer et al., 2001), intercalation into liposomes (Burke et al., 1992; Cortesi et al., 1997), solubilization in microemulsions (Cortesi et al., 1997), formation of inclusion complexes with cyclodextrins (Kang et al., 2002) and entrapment in microspheres (Shenderova et al., 1999; Tong et al., 2003). However, concerning long circulation carriers of CPT in blood stream, there was not enough information.

Drug carriers with longer retention time in the blood stream can be delivered to solid tumors site by a passive

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5498 5048; fax: +81 3 5498 5048.
E-mail address: yoshie@hoshi.ac.jp (Y. Maitani).

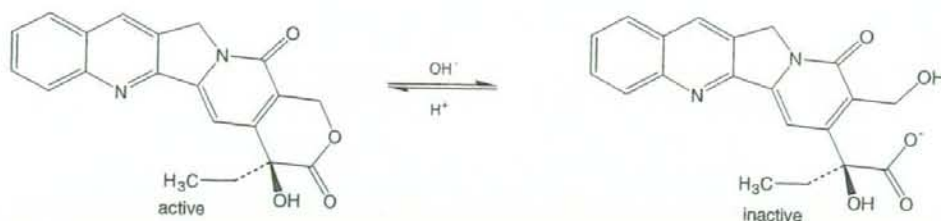


Fig. 1. The structure of camptothecin and equilibrium reaction between the active form and inactive form.

targeting mechanism based on the enhanced permeability and retention effect (EPR effect) (Matsumura and Maeda, 1986; Maeda, 2000; Maeda et al., 2000). Recently, anti-tumor drug targeting using polymeric micelle carrier systems was achieved with doxorubicin (adriamycin, ADR) using poly(ethylene glycol)–poly(aspartate derivative) block copolymer PEG-P(Asp(R)) (Yokoyama et al., 1987, 1990, 1991, 1998). As a result of selective delivery to tumor site by the EPR effect, dramatically enhanced antitumor effects were obtained in vivo (Yokoyama et al., 1999). In this system, ADR was chemically conjugated to the aspartic acid residue of the block copolymer as hydrophobic species for micelle formation and enhance the physical incorporation of ADR in the inner core. However, the chemically conjugated ADR did not play a role in the expression of anticancer activity (Yokoyama et al., 1999, 1998). Only the physically incorporated ADR expressed selective anticancer activity by being recruited to solid tumor sites.

In previous studies, we reported polymeric micelle system for incorporation of CPT, in which CPT incorporation efficiency and CPT-loaded micelles stability were improved by modification of a hydrophobic segment of the PEG-P(Asp) (Yokoyama et al., 2004; Opanasopit et al., 2004). Chemical structure of block copolymers would largely influence to the stability of polymeric micelles in blood stream. In this study, the in vivo circulation stability of CPT-loaded micelles was evaluated in terms of copolymer composition (PEG length, Asp unit number, ester groups, and esterification degree) and feeding ratio of the drug to copolymer, and compared with incorporation stability of CPT. CPT-loaded micelles with a stable copolymer composition enhanced the circulation time of CPT in the blood stream, which will contribute to recruitment to solid tumor sites.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly(ethylene glycol)–poly(β -benzyl L-aspartate) block copolymer (PEG–PBLA) was synthesized as described previously (Yokoyama et al., 1992). (S)-(+)-CPT was purchased from Aldrich Chem. Co. (Milw., WI, USA). 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]7-undecene (DBU), high performance liquid chromatography (HPLC) grade acetonitrile and triethylamine acetate were purchased from Wako Pure Chemicals, (Tokyo, Japan). *N,N*-dimethylformamide (DMF) was dried over a molecular sieve (4A), and distilled under reduced pressure. Other chemicals were of reagent grade.

2.2. Synthesis of diblock copolymers (PEG–PBLA and its derivatives)

Poly(ethylene glycol)–poly(β -benzyl L-aspartate) block copolymer (PEG–PBLA) was synthesized by ring-opening polymerization of benzyl L-aspartate *N*-carboxy anhydride from a terminal primary amino group of α -methyl- ω -amino-poly(oxyethylene), and poly(ethylene glycol)–poly(aspartic acid) block copolymer (PEG-P(Asp)) was obtained by alkaline hydrolysis of PEG–PBLA as reported previously (Yokoyama et al., 1992). Briefly, PEG–PBLA was dispersed in a measured volume of 0.5N NaOH that contained 1.5 mol. equivalents of NaOH to the benzyl aspartate residue of PEG–PBLA. With stirring at room temperature, the solution became homogeneous in approximately 15 min. Then, 6N HCl was added (10 mol. equivalents of HCl to the benzyl aspartate residue) to the solution, and this solution was dialyzed against 0.1N HCl, followed by distilled water using a SpectraPor®-6 dialysis membrane (MWCO: 1000). PEG-P(Asp) block copolymer was obtained by freeze-drying the dialyzed solution.

Esterification of the aspartic acid residues was achieved through nucleophilic substitution of the carboxyl group with a halogen compound using 1,8-diazabicyclo [5,4,0] 7-undecene (DBU) as a catalyst, as reported previously (Opanasopit et al., 2004). PEG-P(Asp) block copolymer was dissolved in DMF and added to a halogen compound or a mixture of two halogen compounds (benzyl bromide, *n*-butyl bromide, or lauryl bromide) and DBU. The reaction mixture was stirred at 50 °C for ca. 16 h. Then, it was poured into a 10-fold volume excess of diethyl ether, and the precipitated polymer was collected by filtration, followed by washing with diethyl ether and drying. In order to remove DBU from the polymer products, polymers were dissolved in DMSO and added to 6N HCl that was much excess equivalents to the aspartic acid residue of the block copolymer. Then, this solution was dialyzed against distilled water, and freeze-dried.

Ester contents of the block copolymers were determined in ^1H NMR spectra by comparing the methylene protons of the hydrophilic PEG block and protons of the hydrophobic moieties of the poly(aspartate) block.

2.3. Preparation of CPT-loaded micelles and CPT solution

CPT was incorporated into polymeric micelles by an evaporation method as reported previously (Opanasopit et al., 2004). Briefly, CPT (0.05, 0.1, 0.2, or 0.4 (CPT/polymer, w/w)) was

dissolved in a mixture of chloroform (1 ml per 1 mg CPT) and acetonitrile (0.67 ml per 1 mg CPT), and added to 5 mg of block copolymer. The solvent was removed by evaporation in a nitrogen gas flow. Then, 3 ml of distilled water was added and sonicated for 2 min using a probe type sonicator model VC 100 (Sonic & Materials Inc., Newtown, Connecticut, USA) equipped with a standard 6 mm probe in a cycle of sonication for 0.5 s and standby for 0.5 s at 80 °C. The solution obtained was centrifuged at $1400 \times g$ for 10 min. Subsequently, the supernatant was collected and filtered through a 1 μm pore-sized nylon filter (Puradisc 25NYL, 6751-2510, Whatman, Clifton, New Jersey, USA). CPT-loaded polymeric micelles were kept in a freezer at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until animal experiments.

The CPT solution was prepared by dissolving CPT (13 mg) in 50 ml of polyethylene glycol 400, propylene glycol and polysorbate 80 (40:50:2, volume ratio) (Yang et al., 1999).

2.4. Determination of CPT content and particle size of micelles

CPT-loaded micelles were dissolved in a mixture of DMSO:H₂O (9:1). The amount of CPT incorporated into polymeric micelles was determined by UV–vis absorption at 365 nm. The incorporation efficiency was calculated as the percentage share of the initial drug used in the preparation for incorporation into the micelles. The mean particle diameters were determined using a dynamic light scattering particle size analyzer (DLS-7000, Otsuka Electronics, Osaka, Japan) at 25 °C by diluting dispersion to an appropriate volume with water.

2.5. Incorporation stability of CPT-loaded micelles evaluated by GPC

The incorporation stability of CPT-loaded micelles was evaluated by gel-permeation chromatography (GPC) as described previously (Yokoyama et al., 1994). GPC was carried out using a Tosoh HPLC system SC-8010 equipped with a Tosoh TSKgel G3000PW_{XL} column. Distilled water was used as the eluent at a flow rate of 1 ml/min at 40 °C. Sample solutions (50 μl) were injected into the column. The detection was performed by measuring absorption at 351 nm for CPT using a Tosoh UV-8010 detector and a refractive index (RI) detector for polymers. A micelle peak was observed at the gel-exclusion volume. GPC with UV detection allowed us to evaluate the nature of the polymeric micelles obtained and the degree of drug incorporation. The peak area detected by UV absorption represents the amount of CPT loaded into the micelles. Therefore, the ratio of the micelle peak area/CPT concentration of the injected sample [CPT] was evaluated as the incorporation stability of CPT-loaded micelles. The small values of the peak area/[CPT] means that most of the CPT was adsorbed to the GPC column by hydrophobic interactions due to unstable packaging of CPT in the micelles. When this ratio was large, CPT was more stably incorporated into micelles.

2.6. Measurement of CPT concentration in plasma

CPT-loaded micelles were intravenously (i.v.) administered to male ddY mice (weighing 18–20 g, Tokyo Laboratory Animal Science Co., Ltd., Tokyo, Japan) via lateral tail veins at a dose of 2.5 mg/kg. For each sampling point, three mice were injected with CPT-loaded micelles. At various time points after the administration, approximately 1 ml of blood was withdrawn using a heparinized syringe and centrifuged at $15,300 \times g$ for 4 min to obtain the plasma. Immediately after that, 0.15 M aqueous phosphoric acid was added to the plasma and mixed vigorously (Onishi et al., 2003). CPT was extracted with chloroform:methanol (4:1 volume ratio). After centrifugation of the mixture at $15,300 \times g$ for 4 min, 25 μl of the chloroform:methanol layer was directly injected into the HPLC system to determine the concentration of CPT. This operation gave the total concentration of free and incorporated CPT in micelles.

The HPLC analysis was performed at room temperature. A Shimadzu LC-10AT (Shimadzu Corp., Japan) apparatus equipped with a Shimadzu RF-10A_{XL} fluorescence detector in which the excitation and emission wavelength was set at 369 and 426 nm, respectively, was used. A Tosoh TSK-gel ODS-80Ts column (150 mm \times 4.6 mm i.d.) was also used. The mobile phase was composed of 23:77 (v/v) acetonitrile–triethylamine acetate buffer (1% (v/v) adjusted to pH 5.5 with glacial acetic acid), and the flow rate was set at 1 ml/min (Warner and Burke, 1997). The areas under the concentration curve (from 0 to 24 h; AUC) were calculated using the trapezoid method.

2.7. Statistical analysis

The results were analyzed statistically using the Student's *t*-test. When comparisons between groups yielded a value for $P < 0.05$, the difference between those groups was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Characterization

Polymeric micelles with a particle diameter of less than 100 nm and a PEG-coated surface have been found to well avoid entrapment by the reticuloendothelial system (RES) and to well leak in diseased areas with highly permeable blood vessels, resulting in passive targeting to the diseased sites (Yokoyama et al., 1993; Kwon et al., 1994); this is known as the EPR effect. In order to sufficiently acquire this EPR effect, we examined the effect of various polymers on the CPT incorporation stability and evaluated the pharmacokinetic profile of CPT-loaded micelles.

Chemical structure of poly(ethylene glycol)–poly(aspartate ester) block copolymer (PEG-P(Asp(R))) is shown in Fig. 2. The block copolymers are coded by the chain lengths of both blocks, the name of the hydrophobic group, and the degree of esterification as summarized in Table 1. For example, 5-27 Bz44 represents a block copolymer composed of a PEG block of molecular weight 5000 and a P(Asp) block possessing 27 units of aspartic acid, in which 44%

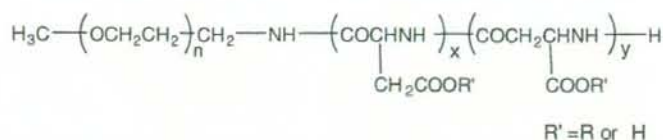


Fig. 2. Chemical structure of poly(ethylene glycol)-poly(aspartate ester) block copolymer (PEG-P(Asp(R))).

Table 1
Poly(ethylene glycol)-poly(aspartate ester) diblock copolymers (PEG-P(Asp(R)))

Code	PEG (MW)	Asp ^a ester (x+y unit)	Ester (R)	Esterification (%)
5-27 Bz44	5000	27.1	Benzyl	44
5-27 Bz57	5000	27.1	Benzyl	57
5-27 Bz75	5000	27.1	Benzyl	75
5-52 Bz74	5000	52.0	Benzyl	74
12-25 Bz71	12000	27.1	Benzyl	71
12-50 Bz63	12000	50.0	Benzyl	63
5-27 <i>n</i> -Bu6 + Bz57	5000	27.1	<i>n</i> -Butyl + benzyl	6 + 57
5-27 Lau5 + Bz58	5000	27.1	Lauryl + benzyl	5 + 58

^a Asp: aspartate.

of the aspartic acid residues are esterified with a benzyl group.

3.2. Ester groups of polymers

To determine the structural requirements for stability, polymers with three kinds of ester groups were synthesized. The incorporation of CPT into polymeric micelles was successfully achieved by the evaporation method which provided high CPT yields (Opanasopit et al., 2004). Table 2 shows the effect of ester groups (benzyl and mixture (benzyl + lauryl, benzyl + *n*-butyl)) on the entrapment efficiency, incorporation stability evaluated by GPC and the % injected dose in plasma after 4 h. When the ratio of micelles peak area/CPT concentration [CPT] was large, the CPT incorporated into the micelles was more stable. CPT micelles of these three ester groups showed similar stability in vitro, but not in vivo. Benzyl polymeric micelles suggested a longer circulation time than *n*-butyl and lauryl ones in spite that the mixture had a more hydrophobic inner core than benzyl. This implies that not only hydrophobicity but also physical factors such as rigidity and π - π interactions of the inner core-forming block contributed to the incorporation, since the lauryl ester (C12) is more hydrophobic than the benzyl ester (C7).

Table 2
Effect of ester group of polymer 5-27 (PEG 5000-Asp unit 27) on stability of CPT-loaded micelles at a feeding ratio (CPT/polymer) of 0.1 (w/w)

Code	Esterification (%) of diblock copolymer	Entrapment efficiency (%) ^a	Peak area/[CPT] ^b	% Injected dose in plasma after 4 h ^c
5-27 <i>n</i> -Bu6 + Bz57	<i>n</i> -Bu 6 + Bz57	37.8	58.1	0.15 ± 0.08
5-27 Lau5 + Bz58	Lauryl 5 + Bz58	47.5	48.3	0.07 ± 0.03
5-27 Bz57	Bz57	88.6	55.3	7.6 ± 0.8
PEG-PBLA	Bz100	67.7	1.5	^d

^a $n = 1-2$.

^b Incorporation stability; peak area, evaluated by GPC, was divided by CPT concentration in micelles [CPT] ($n = 1-2$).

^c Results at a dose of 2.5 mg/kg are given as the mean ± S.D. ($n = 3$).

^d Not done.

Table 3
Effect of PEG length (5000 or 12,000) and Asp unit (27 or 50) on stability of CPT-loaded micelles at a feeding ratio (CPT/polymer) of 0.4 (w/w)

Code	Peak area/[CPT] ^a	% Injected dose in plasma after 4 h ^b
5-27 Bz75	46.5	9.3 ± 1.8
12-25 Bz71	26.5	2.6 ± 0.6
5-52 Bz74	86.1	6.7 ± 0.5
12-50 Bz63	21.9	2.2 ± 0.4
CPT-solution ^c	^d	0.04 ± 0.03

^a Incorporation stability; peak area, evaluated by GPC, was divided by CPT concentration in micelles [CPT] ($n = 1-2$).

^b Results at a dose of 2.5 mg/kg are given as the mean ± S.D. ($n = 3$).

^c CPT was dissolved in polyethylene glycol 400:propylene glycol: Tween 80 = 40:58:2 (volume ratio).

^d Not done.

PEG-PBLA can be handled as benzyl-100% because its aspartic acid residues were fully benzylated. However, in the stability assay using GPC, PEG-PBLA micelles provided much lower incorporation stability than the benzyl-57% block copolymer. This indicates that the conformation and/or configuration of the hydrophobic inner core-forming polymer block contributes to a stable incorporation by providing the appropriate space for CPT.

3.3. PEG length and Asp unit of polymers

To determine the contribution of PEG length and Asp unit to the micelles' stability, four polymeric micelles of Bz with different combinations of PEG length (5000 or 12,000) and Asp units (27 and 50) were prepared (Table 3). Compared with the CPT solution as a control, at both 27 and 50 Asp units, CPT micelles of PEG 5000 showed a longer circulation than those of PEG 12,000 in vivo.

An increase in the chain length of a hydrophobic block at a given chain length of a hydrophilic block causes a decrease in the critical micelle concentration (CMC) (Leibler et al., 1983). In contrast, the ADR-loaded PEG-P(Asp(ADR)) micelles, pos-