

光増感剤を高効率に内封する生体適合性ナノ粒子調製プロセスの構築

主任研究者 小野 努 岡山大学大学院環境学研究科資源循環学専攻 准教授
分担研究者 阪田 功 (株)光ケミカル研究所 常務取締役

研究要旨

疎水性の高い光増感剤のような化合物を安全で高効率に腫瘍近傍へ送達することは、光線力学的治療（PDT）の治療効果を高め、患者のクオリティー・オブ・ライフ（QOL）向上のために重要な技術である。静脈注射での投与を可能にするためには、この疎水性の高い光増感剤を安定に内封した 100 nm 程度のドラッグキャリアの開発が強く求められている。そこで本研究では、血中滞留性が高く高効率で機能性ポルフィリンやレチノイド化合物を内封できる光線力学的治療用ナノ運搬体の創製を目的として、様々なナノサイズの運搬体調製を試み、機能性ポルフィリンを高効率で内封する手法を検討してきた。その結果、リボソームやエマルション製剤よりも疎水性ポリマーコアを有し、表面に親水性ポリマー鎖を有するナノ粒子の調製が、機能性ポルフィリンなどの疎水性薬物を内封した PDT 用ドラッグキャリアとして有望であることが示唆され、本ナノ粒子の PDT に有効なドラッグキャリアとしての設計因子について詳細に検討した。ポリ乳酸（PLA）-ポリエチレングリコール（PEG）のジブロックコポリマーを用いた簡便な手法によって、光増感剤含有率 10%を超える 100nm 以下のナノ粒子調製手法を開発した。

A. 研究目的

外部から腫瘍組織選択的に印加する光刺激によって局所的な抗がん効果を期待する光線力学的治療（PDT）は、従来の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、抗がん剤の大量投与による正常細胞への副作用が少なく、局所的な治療が可能な今後有効な抗がん治療法のひとつと期待される。この PDT を実現するためには、光増感物質を腫瘍組織内部へ安定に送達する技術基盤の

確立が不可欠であり、本研究では PDT に有効な光増感物質の安定なデリバリーを実現できるナノキャリアの創製に取り組む。ナノ粒子は正常組織においては血管外へ漏出しにくい一方で、血管の透過性が亢進している腫瘍組織では血管外へと漏出するため、静脈内投与後の血中滞留性が高いナノ粒子内部に薬物を封入することで、高い腫瘍中薬物濃度を達成できることが知られている。そのため、PDT に必要なポルフィリ

ン類を高効率で封入可能なナノ運搬体の調製技術を構築することに加えて、腫瘍組織への移行の駆動力となる高い血中濃度が維持可能な血中滞留型ナノ運搬体を創製することでPDTへの適用を目指している。また、疎水性薬物を高効率で内封するといった機能は、殺細胞効果とは作用機序の異なる抗腫瘍効果をもたらすことの期待されるレチノイド化合物の同時使用にも展開が可能であり、複数の薬剤を併用可能な多機能型ナノ運搬体としての発展が期待される。

昨年度まで、ポルフィリン類のような疎水性の高い光増感物質を安定に内封できるナノサイズのキャリア創製を目的として、脂質二分子膜で覆われたリポソーム、水中油滴型(O/W)エマルジョン、ナノ粒子など様々なドラッグキャリア調製を試み、内封された光増感剤の機能を有効に発揮できるキャリアの選定を行ってきた。その結果として、ポルフィリンを高効率で含有可能で且つ 100 nm 以下にサイズ制御可能な生体適合性ナノ粒子が最も有望であることが示唆され、本年度はこのジブロックコポリマーによって調製されるナノ粒子の設計因子について詳細に検討を行った。

B. 研究方法

機能性ポルフィリンの合成

(株)光ケミカル研究所において、PDTに有効な機能性ポルフィリンの開発が進められ、PDTに用いる際の光の波長域が高波長側にシフトしたもののほど、生体成分による妨害を受けず、照射した光が深部に届くことが知られている。

本研究では、Figure 1 に示した(株)光ケミカル研究所製のフォトプロトポルフィリン IX ジメチルエステル(I)を用いて検討を行った [1]。600 nm 以下の光をカットしたフィルターにおいて十分な一重項酸素生成能力があり、実際の PDT にお

いては、672 nm 付近の高波長域の光照射が可能な光増感剤である。

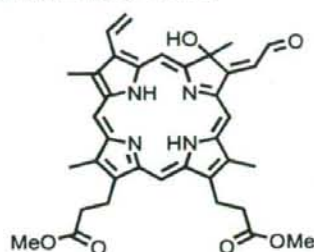


Figure 1. Photoprotoporphyrin IX dimethyl ester (I) の構造式

ジブロックコポリマーの合成

PDT に有効なドラッグキャリアとしては、疎水性の高い光増感剤を高効率で内封するために疎水性のコアを有し、さらに血中滞留性を向上させるために必要なポリオキシエチレン鎖のような親水性高分子鎖で表面を覆われたナノ粒子が要求されるため、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖とポリ乳酸 (PLA) のジブロックコポリマー (PLE, Figure 2) を合成した。

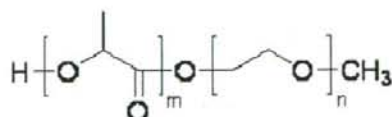


Figure 2. PLE の分子構造

PLE は末端をメトキシ化したポリエチレングリコール (MeOPEG) を開始剤とする D,L-ラクチドの開環重合によって合成した。洗浄後よく乾燥させたアンプル管へ、ラクチドと MeOPEG を入れ、触媒 (2-エチルヘキサン酸スズ(II)/トルエン) を加えた。そして、アンプル管内を 1 時間、減圧した後、封管した。封管後、あらかじめ 130℃ にしておいたシリコンオイルバスに入れた。オイルバスに入れて約 10 分後にラクチド

や開始剤が溶解するまで、よく振って溶液が均一になるようにした。その後オイルバス内でアンブル管を静置し、24時間反応させた。反応終了後、オイルバスからアンブル管を取り出し室温で放冷した。

ポリマーをクロロホルムに溶解させ、ろ過を行いながらヘキサンの中に注ぎ、再沈殿を行った。ポリマーは再沈殿剤に溶解しないため、ヘキサン中に析出した。その後、未反応モノマー除去のため、析出したポリマーの2-プロパノール中で再結晶操作を行った。析出物を2-プロパノール中へ入れ、加熱し攪拌を行った。溶液が透明になり、ポリマーが完全に溶解したのを確認した後、加熱攪拌をやめ、室温で放置または氷水を用いて冷却を行った。その後析出したポリマーを遠心分離または濾過によって回収し乾燥を行った後、GPC(カラム: Super H-H (B0011), Super HM-H (B0026), Super HM-H (B0027), Super H2000 (B0025) 溶離液: Tetra hydro fulane (THF)) 及び ¹H NMR(溶媒: 重クロロホルム)により合成物の確認を行った。

Table 1. HLB 値の検討で用いた PLE 組成

RUN No.	PLE Mw.*	PLE Mw/Mn	PLA /PEG	HLB
w-PLE-1	5,500	1.06	0.26	15.82
o-PLE-1	14,000	1.34	2.18	6.28
o-PLE-2	11,000	1.14	1.43	8.23
o-PLE-4	40,000	1.61	8.05	2.21
o-PLE-5	33,000	1.32	6.47	2.68

*: PEG Mw は全て 4,400

Table 2. 本研究で用いた主な PLE 組成

RUN No.	PLE Mw.*	PLE Mw/Mn	PLA /PEG	HLB
w-PLE	5,200	1.07	0.20	16.63
o-PLE	33,000	1.32	6.47	2.68

*: PEG Mw は全て 4,400

様々な分子量を有する PLE を合成して、その分子量および親水性-疎水性バランス (HLB) が機能性ポルフィリン内封ナノ粒子調製に与える影響について検討した。なお、Table 1 には HLB 値について検討した際に用いた合成 PLE 組成についてまとめ、Table 2 では、そのうちで最適な HLB 組成を決定後、以降の実験で用いた主な合成 PLE 組成をまとめた。

PLE ナノ粒子の調製

合成した油溶性 PLE を 2 ml 酢酸エチルに溶解させ、これを油相とした。続いて、水溶性 PLE を 4 ml の超純水に溶解させ PLE 水溶液を調製した。そして、この PLE 水溶液又は超純水を水相として使用した。油相に水相を加え、超音波ホモジナイザーを用いて 160 W, 15 sec で O/W エマルジョンを調製した。調製の際ホモジナイザーの先端は油水界面になるようにした。そして、調製した O/W エマルジョンの 1 部を使用して、エマルジョンの液滴径をゼータサイザーにより測定した。なお、エマルジョンは調製直後及び調製して 10 分後のものについて測定を行った。残りの O/W エマルジョンは調製直後とエマルジョンのゼータサイザー測定 (エマルジョン調製直後、エマルジョン調製から 10 分後) 終了時に超純水に添加することにより希釈した。そして、これらの粒径をゼータサイザーにより測定した。なお、ゼータサイザーによる測定は 23°C で行った。

ポルフィリン含有 PLE ナノ粒子の調製

所定量のポルフィリンを酢酸エチルに溶解させ、上記と同様の手順で PLE ナノ粒子を調製した。その際、ナノ粒子とポルフィリン凝集物を分離するため、0.22 μm の限外濾過を行い、2 回の洗浄後、凍結乾燥によりポルフィリン含有 PLE ナノ粒子を得た。

限外濾過を行ったフィルターをクロロホ

ルムに溶解させ、紫外可視吸光度計により 672 nm における吸光度を測定し、検量線よりクロロホルム溶液中のポルフィリン濃度を算出することで、フィルター上のポルフィリン量を算出した。そして、算出したポルフィリン量を以下の式に代入することで、ポルフィリンの内封率を測定した。

内封率 [%] = $\{1 - (\text{フィルター上のポルフィリン量}[\text{mg}] / \text{仕込みポルフィリン量}[\text{mg}])\} \times 100$

また、洗浄したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子分散液を凍結乾燥し、ポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を回収した。回収したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を所定量クロロホルムに溶解させ、紫外可視吸光度計により 672 nm における吸光度を測定し、検量線よりクロロホルム溶液中のポルフィリン濃度を算出することで、測定に使用したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子中のポルフィリン量を導出した。算出したポルフィリン量を以下の式に代入することで、ポルフィリンの含有量を測定した。

含有率 [wt%] = $(\text{測定粒子中のポルフィリン量}[\text{mg}] / \text{測定粒子}[\text{mg}]) \times 100$

一重項酸素発現の確認 [2,3]

回収したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を Dansyl-L-methionine を溶解させたリン酸緩衝液に分散させた。この分散液に照射し、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いることでポルフィリン内封ナノ粒子からの一重項酸素の発現を確認した。照射開始から 1~60 分後の分散液を TLC にうち、数時間静置しスポット中の溶媒を揮発させた。スポットの溶媒が揮発したのを確認した後、クロロホルム/メタノール = 3/2 の混合溶媒を用いて展開させ、展開溶媒が揮発

した後に UV ランプを照射することでスポットの確認を行った。UV ランプの波長は 256 nm 又は 365 nm を使用した。測定に用いている Dansyl-L-methionine は一重項酸素の酸化作用により、Dansyl-L-methionine sulfoxide に変化する。また今回の条件下において Dansyl-L-methionine sulfoxide のスポットの Rf 値は 0.5 付近であることが報告 [2,3] されているため、このスポットを確認することにより一重項酸素発現の確認を行った。また、画像解析ソフト Image J を用いて、Dansyl-L-methionine のスポット (S1) と Dansyl-L-methionine sulfoxide のスポット (S2) の強度の比較を行った。

C. 研究結果

PLE ナノ粒子調製におよぼす PLE の HLB 値の影響

Figure 3(a)および(b)に液滴径と o-PLE の HLB 値との関係を示した。水溶性 PLE を添加しない場合、HLB 値の増加に伴い液滴径が大きく減少した。これは、HLB 値の減少することで油性 PLE の水溶性が上昇し、それに伴い PLE 分子の界面活性能が増加し、水-酢酸エチル間の界面張力が減少することで液滴が小さな液滴径でも安定に存在できるようになったと考えられる。

これに対して、水溶性 PLE を添加した系においては、HLB 値の違いによる液滴径の変化はほとんど無かった。これは、水溶性 PLE の存在下において、油性 PLE の界面張力に及ぼす影響がほとんど無視できるためであると考えられる。

液滴径について比較すると、水溶性 PLE の添加により、著しく液滴径が減少していることが明らかであり、このことは、界面活性剤として機能している水溶性 PLE の効果を明確にするものである。ナノ

粒子は液滴からの溶媒拡散によって形成すると考えられるため、前駆体である液滴径を小さくすることは、より小さな PLE ナノ粒子を作製するうえで非常に重要であると言える。

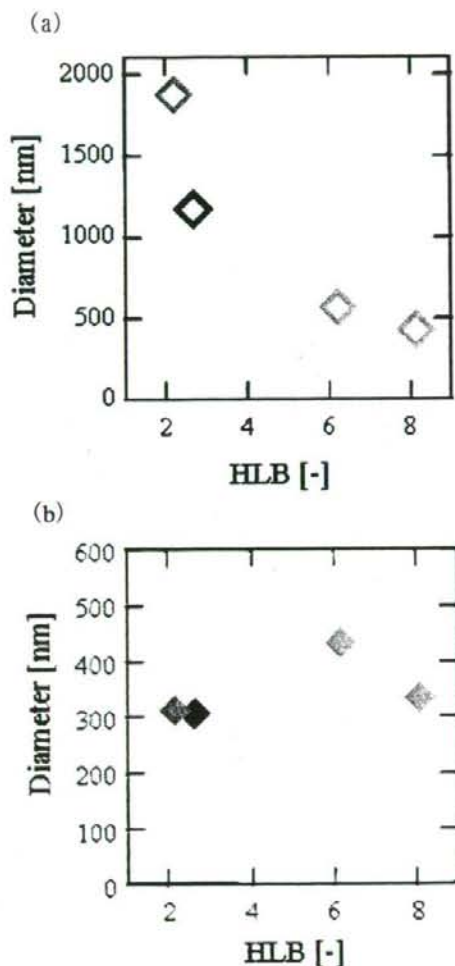


Figure 3. 液滴径におよぼす油溶性 PLE の HLB 値の影響：(a) 水溶性 PLE なし、(b) w-PLA-1 1 wt% 添加

以降の実験では、比較的小さな液滴径を調製可能な HLB 値 2.68 の油溶性 PLE (o-PLA-5) を用いることとする。

PLE ナノ粒子径におよぼす水溶性 PLE の影響

Figure 4 には、最終的に得られた PLE ナノ粒子径におよぼす水溶性 PLE 濃度の影響を示した。

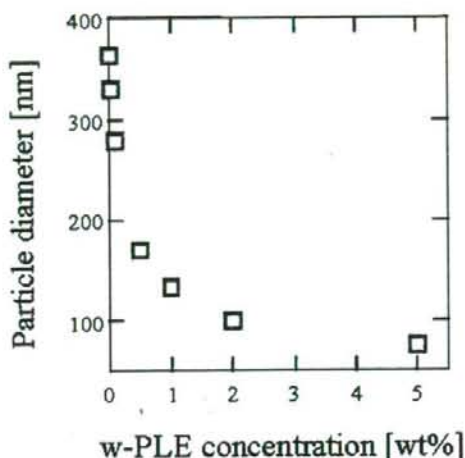


Figure 4. 水溶性 PLE 添加量とナノ粒子径の関係

ナノ粒子調製前の液滴径もまた、水溶性 PLE 濃度の増加とともに大きく低下することも観察しており、水溶性 PLE が水-酢酸エチル間の界面張力を減少させて、その結果、1 wt%以上の w-PLA を添加することで、体内における EPR 効果に有効な 150 nm 以下のナノ粒子調製が可能であることが確かめられた。

PLE ナノ粒子径におよぼす超音波照射強度の影響

水-酢酸エチル溶液は超音波照射によって微細な液滴に分散させている。この際に用いる超音波照射強度は、最終的に得られる PLE ナノ粒子径にも影響していると考えられるため、PLE ナノ粒子径におよぼす超音波出力強度の影響について検

討した。Figure 5 にその結果を示した。

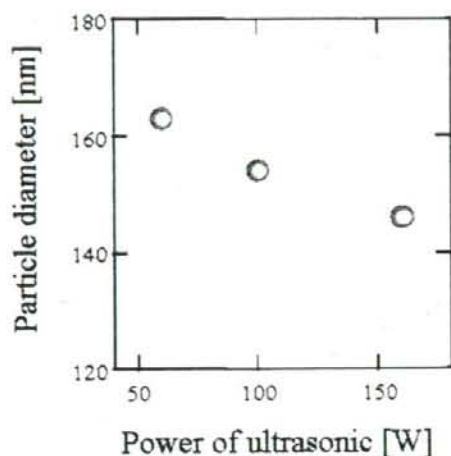


Figure 5. PLE ナノ粒子径におよぼす分散液調製時の超音波出力の影響

このように、超音波の出力増加とともに得られる PLE ナノ粒子の粒径は減少することが分かる。超音波の出力が増加すると、溶液中での剪断力が増加するため、その結果、より小さな液滴が生成したものと考えられる。

PLE ナノ粒子径におよぼす油溶性 PLE 量の影響

油溶性 PLE は最終的なナノ粒子骨格ともなるため、用いる油溶性 PLE 量もまた PLE ナノ粒子径に影響を与えると推測される。Figure 6 に用いた油溶性 PLE 量と得られる PLE ナノ粒子径の関係を示す。

PLE 量の増加とともに、得られる PLE ナノ粒子の粒径は増加していくことが分かる。ナノ粒子化前の液滴状態では、油溶性 PLE 量の影響はほとんど見られないことから、油溶性 PLE が界面活性剤として作用することなく、溶媒拡散の段階でナノ粒子マトリクスの増加のために最終

的な粒径を増加させていることが分かる。このことから、微小な PLE ナノ粒子を調製するためには、比較的少ない油溶性 PLE 量を用いる必要があり、目的とする PLE ナノ粒子設計において重要な因子であることが示唆された。

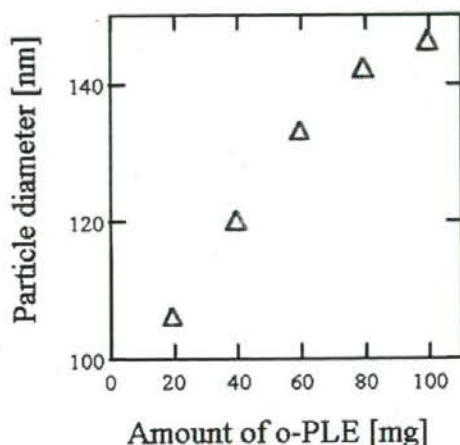


Figure 6. PLE ナノ粒子径におよぼす油溶性 PLE 量の影響

光増感剤含有 PLE ナノ粒子の調製

上述の操作因子を基に、実際に（株）光ケミカル研究所にて開発された光増感剤であるフォトプロトポルフィリン IX ジメチルエステル (I) (以下、ポルフィリンと略記) を内封した PLE ナノ粒子の調製を行った。添加したポルフィリン量がポルフィリン含有 PLE ナノ粒子に与える影響について、粒径・内封率・含有量の点から検討した。

PLE ナノ粒子径におよぼすポルフィリン添加量の影響を Figure 7 に示した。この結果、添加するポルフィリン量を増加させてもほぼ変化なく 100 nm 以下の PLE ナノ粒子が得られていることが分かった。従って、ポルフィリンの含有によりナノ粒子同士の凝集や合一がほとんど起こら

ず、PLE によって目的とするサイズのナノ粒子調製が可能であることを示唆するものである。

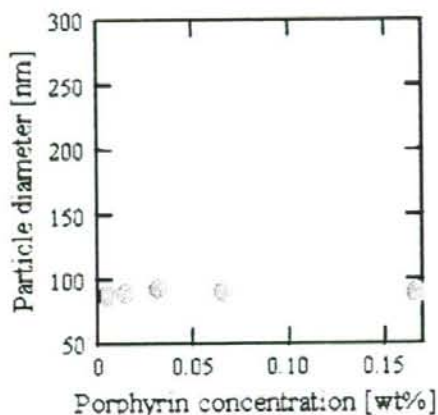


Figure 7. PLE ナノ粒子径におよぼすポルフィリン添加量の影響

ポルフィリン添加量とその内封率について検討した結果、Figure 8 のようになった。

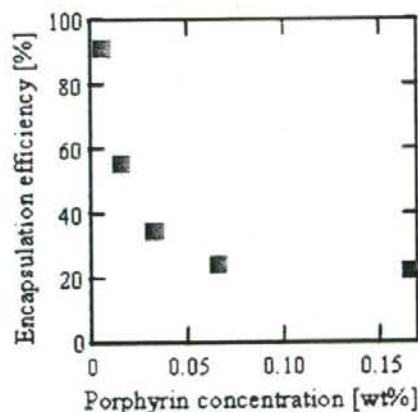


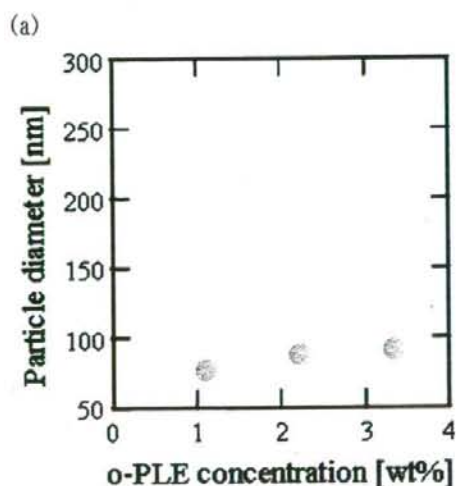
Figure 8. PLE ナノ粒子への内封率とポルフィリン添加量の関係

ポルフィリンの添加量の増加とともに内封率は大きく低下している。このこと

は、ポルフィリン内封量に上限があり、既に飽和していることを示唆しており、内封されていないポルフィリンのほとんどは凝集物としてフィルターによって濾過されていると考えることができる。詳細な検討を進めていった結果、このポルフィリン内封量の飽和現象は、酢酸エチルに対するポルフィリンの飽和溶解量と関連しており、PLE ナノ粒子への内封量も有機溶媒への溶解量によって制御できることが考えられる。

PLE ナノ粒子中へのポルフィリン含有量については、いずれのポルフィリン添加量においても1~2%で一定であり、上述の酢酸エチルへの飽和ポルフィリン溶解量が PLE ナノ粒子への内封率増加を妨げていることを支持するものであると言える。

なお、油性 PLE 量を変化させることによってポルフィリン内封量を向上させることが本研究結果から明らかとなった (Figure 9)。油性 PLE 量の減少とともにナノ粒子径は減少して 1 wt% o-PLE では約 70 nm 程度となったが、そのときの PLE ナノ粒子中のポルフィリン含有量は 10 wt% を超えるものとなった。



(b)

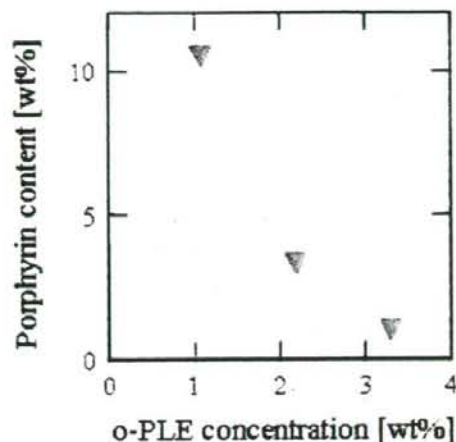


Figure 9. 油溶性 PLE 量と PLE ナノ粒子径 (a) およびポルフィリン含有量 (b) との関係

これはポルフィリン含有 PLE ナノ粒子中の PLE の割合を減少させたことによるポルフィリン含有率の向上であり、ドラッグキャリアの生産効率としては低下してしまうものでもある。今後は、これまで得られた PLE ナノ粒子中へのポルフィリン包括機構の知見に基づき、有機溶媒やジブロックコポリマー組成などを改良することで、ドラッグキャリアとしての生産効率を低下させずにポルフィリン含有率を向上させる方法について検討する必要があると考えられる。

一重項酸素発現の確認

PLE ナノ粒子中に内封された光増感剤であるポルフィリンが、外部からの光照射によって光増感作用を示し、酸素分子から一重項酸素を生成し、ナノ粒子外部へ一重項酸素が放出されているかを確認する。PDT における抗腫瘍効果は、この一重項酸素が細胞へダメージを与えることが原因とされており、ナノ粒子中の光増

感剤が十分に機能するかどうかを *in vitro* で確認することは非常に重要なことである。

本研究では、一重項酸素を感知して分子内の吸収スペクトルを変化させることのできる Dansyl-L-methionine の酸化作用を用いて薄層クロマトグラフィー (TLC) による評価を行った (Figure 10)

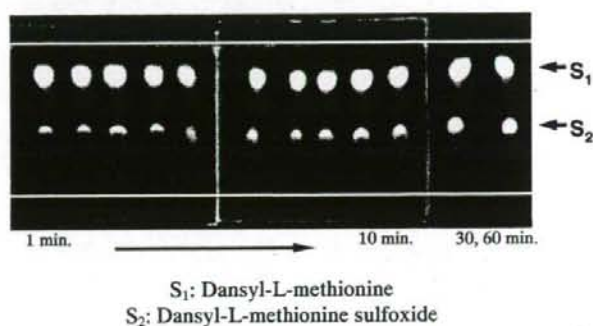


Figure 10. ポルフィリン含有 PLE ナノ粒子を用いた Dansyl-L-methionine の酸化作用

光照射時間とともに Dansyl-L-methionine sulfoxide (S₂) のスポットが大きくなっていることが分かる。これにより、PLE ナノ粒子に内封されたポルフィリンから一重項酸素が生成し、ナノ粒子外にある基質がそれを受け取ることが可能ことが示唆された。このことは、ポルフィリンは PLE ナノ粒子内に内封されたままでも、光照射によって抗腫瘍効果を示すことを期待させるものであり、今後の *in vitro*, *in vivo* 実験において有望な結果であるといえる。

D. 考察

昨年度より、リポソーム、ナノエマルジョン、ナノ粒子と様々な薬物キャリアについて検討を行ってきたが、簡便な操作で薬物を高効率で内封し、生体内においても高い滞留性と安定性に富んだポリ

エチレングリコール-ポリ乳酸系 (PLE) ナノ粒子が PDT 用薬物運搬体として最も有望であることが明らかとなった。本年度は特に、その PLE ナノ粒子の調製因子について詳細な検討を行うことによって、光増感剤の高含有率の PLE ナノ粒子調製に成功した。

水溶性 PLE は界面活性剤として働くことによって PLE ナノ粒子の粒径を小さくすることが可能であり、超音波照射強度もまた、溶液中の剪断力を高めることによって、より微細な液滴分散液を調製できることを示している。

また、油性 PLE はナノ粒子骨格を担っていることから、ポルフィリン含有量を向上させたい場合には、油性 PLE の低減によって含有率を 10% 以上にまで上げることを可能としている。

ポルフィリン内封率については、使用するポルフィリン量が多いと、ポルフィリン自体の凝集物を生成し、その結果、内封率が低下してしまうが、これは溶媒である酢酸エチルへの溶解量に起因するものであって、ポルフィリン量を制御することによって高い内封率も実現可能である。

このように、静脈注射に適用可能な 100 nm 程度の光増感剤内封ナノ粒子をある程度任意で調製でき、ナノ粒子調製プロセスの設計が大きく前進したと言える。今後は、*in vitro* あるいは *in vivo* での機能評価の知見をさらに得ながら、より緻密な粒子設計が必要となってくるであろう。本研究で得られているナノ運搬体が、生体内においてどの程度の徐放特性を有し、どのような機構で抗腫瘍効果をおよぼしているかを明確にすることは、極めて重要であり、最終年度は本 PLE ナノ粒子の体内動態挙動を制御できる粒子設計まで検討を広げていきたいと考えている。

E. 結論

本年度の研究成果として、機能性ポルフィリンを高効率で含有可能なナノキャリア設計に関する操作因子について明らかにした。また、100 nm 以下で調製された PLE ナノ粒子に内封されたポルフィリンから一重項酸素が生成され、溶液中に放出されていることを実験的に明らかにすることに成功した。さらに、同ナノ粒子は分担研究者である大河原によって colon26 細胞を用いた *in vitro* 実験系において効率的な殺細胞効果が確認されている。

最終年度はポルフィリン含有 PLE ナノ粒子からの作用機序を解明していくとともに、*in vivo* での抗腫瘍効果および体内動態において優れたナノマテリアルの設計と調製プロセスの構築を重点的に行っていく。さらに、本製剤は脂溶性化合物の高効率封入と腫瘍組織への蓄積性の改善を同時に達成するものであり、PDT とは作用機序を有するアポトーシス誘導によるレチノイド化合物などを利用して、ナノ運搬体内に同時に内封することによって相乗的な抗腫瘍効果についても、*in vivo* および *in vitro* 実験系を通して追求していく。

本年度の研究目標は概ねクリアしており、これまでにない簡便な疎水性薬物内封技術を確立したと言える。本技術は生産効率としても優れており、今後の PDT における有望な薬物キャリアとして展開できるものと期待される。

参考文献

- [1] 特願 2008-118187
- [2] Y. Nakae, E. Fukusaki, S. Kajiyama, A. Kobayashi, I. Sakata, Convenient screening methods for the photosensitivity, J. Photochem. Photobiol. A, 171, 91-95 (2005)

[3] Y. Nakae, E. Fukusaki, S. Kajiyama, A. Kobayashi, S. Nakajima, I. Sakata, Syntheses and screening tests of new chlorin derivatives as photosensitizer, *J. Photochem. Photobiol. A*, 174, 187-193 (2005)

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka, ATX-S10(Na)-photodynamic therapy inhibits cytokine secretion and proliferation of lymphocytes, *J. Dermatological Sci.*, 49, 174-177 (2008)

2) K. Takeda, T. Kunisada, S. Miyazawa, Y. Nakae, T. Ozaki, Photodynamic therapy with ATX-S10-Na(II) Inhibits synovial sarcoma cell growth, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 466, 1726-1733 (2008)

3) E. Kamio, S. Yonemura, T. Ono, and H. Yoshizawa "Microcapsules with Macroholes Prepared by the Competitive Adsorption of Surfactants on Emulsion Droplet Surfaces" *Langmuir*, 24(23), 13287-13298 (2008)

4) T. Nakashima, T. Ono "Effects of Dispersion Stabilizer and Reaction Solvent on Forming Monodisperse Polystyrene Microspheres by Dispersion Polymerization" *Colloid Polym. Sci.*, 286, 1587-1592 (2008)

5) K. Tomita, T. Ono "Synthesis of polyaspartate macromonomer having a vinyl end group and application to dispersion copolymerization of styrene" *Colloid Polym. Sci.*, 287, 109-113 (2009)

6) M. Muranaka, T. Ono "Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres by Dispersion Polymerization Using a Polymeric Stabilizer with Hydroxyl Groups" *Macromol. Rapid Commun.*, 30, 152-156 (2009)

7) S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida, Release behavior from hydrogen-bonded polymer gel prepared by pressurization, *J. Applied Polym. Sci.*, in press

2. 学会発表

1) 岡本芳晴, 田邊茂之, 柄武志, 南三郎, 中島進, 仲江良則, 阪田功, 早期照射による光増感物質 PAD-S31 の低用量化の検討, 第18回日本光線力学学会学術講演会, 名古屋, 2008年6月14-15日

2) K. Tomita, T. Ono, Preparation of polymeric particles with poly(aspartic acid) hairy chains, 48th Microsymposium of Prague Meetings on macromolecules, Prague, Czech Republic, 2008年7月20-24日

3) M. Muranaka, T. Ono, Design of polymeric dispersion stabilizer for preparation of monodisperse polylactide microspheres, 48th Microsymposium of Prague Meetings on macromolecules, Prague, Czech Republic,

2008年7月20-24日

4) 富田恵介, 小野努, マクロモノマー分散共重合による単分散ヘア粒子の調製, 第61回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008年9月7-9日

5) 村中誠, 小野努, 分散重合における単分散ポリラクチドミクロスフェアの粒径制御, 第61回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008年9月7-9日

6) 安川政宏, 神尾英治, 小野努, 水性二相系を利用した W/W/O エマルションの調製, 化学工学会第40回秋季大会講演要旨集, 仙台, 2008年9月24-26日

7) 廣田健, 村中誠, 小野努, 阪田功, 光線力学的治療に有効なポルフィリン内封ナノ粒子の開発, 化学工学会第40回秋季大会講演要旨集, 仙台, 2008年9月24-26日

8) 安川政宏, 神尾英治, 小野努, 水性二相系を利用した W/W/O エマルションの調製, 第15回高分子ミクロスフェア討論会講演要旨集, 神戸, 2008年11月12-14日

9) 大浦浩平, 久保田潤, 小野努, 界面活性 TEMPO 誘導体を利用した不均一系重合, 第15回高分子ミクロスフェア討論会講演要旨集, 神戸, 2008年11月12-14日

10) 安川政宏, 小野努, 木村幸敬, 神尾英治, 水溶性高分子による相分離を利用した複合エマルションの調製, 高分子材料のための俯瞰的シンポジウム, 京都, 2009年1月13-14日

11) 廣田健, 村中誠, 小野努, 木村幸敬,

白石太朗, 大河原賢一, 檜垣和孝, 木村聰城郎, ポルフィリン内封ナノ粒子の開発と光線力学的治療への応用, 高分子材料のための俯瞰的シンポジウム, 京都, 2009年1月13-14日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2008-118187, 阪田功他, 「皮膚疾患治療剤」 2008年4月30日

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
J. Yokoe, S. Sakuragi, K. Yamamoto, T. Teragaki, K. Ogawara, K. Higaki, N. Katayama, T. Kai, M. Sato and T. Kimura	Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats	Int. J. Pharm.	353	28-34	2008
K. Ogawara, K. Un, K. Minato, K. Tanaka, K. Higaki and T. Kimura	Determinants for in-vivo anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: Importance of vascular permeability within tumors	Int. J. Pharm.,	359	234-240	2008
T. Shehata, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura	Prolongation of residence time of liposome by surface modification with mixture of hydrophilic polymers	Int. J. Pharm.	359	272-279	2008
阪田功ら	皮膚疾患治療剤	特願 2008-118187			2008
H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka	ATX-S10(Na)-photodynamic therapy inhibits cytokine secretion and proliferation of lymphocytes	J. Dermatological Sci.	49	174-177	2008
K. Takeda, T. Kunisada, S. Miyazawa, Y. Nakae, T. Ozaki	Photodynamic therapy with ATX-S10-Na(II) Inhibits synovial sarcoma cell growth	Clin. Orthop. Relat. Res.	466	1726-1733	2008
E. Kamio, S. Yonemura, T. Ono, and H. Yoshizawa	Microcapsules with Macroholes Prepared by the Competitive Adsorption of Surfactants on Emulsion Droplet Surfaces	Langmuir	24	13287-13298	2008

T. Nakashima, T. Ono	Effects of Dispersion Stabilizer and Reaction Solvent on Forming Monodisperse Polystyrene Microspheres by Dispersion Polymerization	Colloid Polym. Sci.	286	1587-1592	2008
K. Tomita, T. Ono	Synthesis of polyaspartate macromonomer having a vinyl end group and application to dispersion copolymerization of styrene	Colloid Polym. Sci.	287	109-113	2009
M. Muranaka, T. Ono	Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres by Dispersion Polymerization Using a Polymeric Stabilizer with Hydroxyl Groups	Macromol. Rapid Commun.	30	152-156	2009
S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida	Release behavior from hydrogen-bonded polymer gel prepared by pressurization	J. Applied Polym. Sci.			in press
大河原賢一, 運敬太, 檜垣和孝, 木村聰城郎	P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキシソルピシン内封PEG修飾リポソームのin vivo抗腫瘍効果とその機構解析	第23回日本薬剤学会要旨集			2008
大河原賢一, 運敬太, 中尾隆明, 檜垣和孝, 木村聰城郎	血管新生阻害薬のエマルジョン製剤化とその抗腫瘍効果の評価	第24回日本DDS学会要旨集			2008
Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura	Formulation and evaluation of PEGylated niosomes for targeted drug delivery	第24回日本DDS学会要旨集			2008

Yuta Yoshizawa, Yusuke Kono, Yoshiko Fukuoka, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura	Development and evaluation of novel nanoparticle formulation of paclitaxel	第23回日本薬 物動態学会要 旨集			2008
Ryosuke Watari, Shuhei Nishiguchi, Ken-ichi Ogawara, Jun-ichi Yokoe, Kazutaka Higaki, Toshiya Kai, Makoto Sato and Toshikiro Kimura	Improvement of in-vivo disposition characteristics and anti-tumor activity of PEG liposomal doxorubicin by rHSA conjugation onto surface of liposome	第23回日本薬 物動態学会要 旨集			2008
岡本芳晴, 田邊茂 之, 柄武志, 南三 郎, 中島進, 仲江 良則, 阪田功	早期照射による光増感 物質PAD-S31の低用量 化の検討	第18回日本光 線力学学会学 術講演会			2008
K. Tomita, T. Ono	Preparation of polymeric particles with poly(aspartic acid) hairy chains	Proceedings of Microsymposi um of Prague Meetings on macromolecul es			2008
M. Muranaka, T. Ono	Design of polymeric dispersion stabilizer for preparation of monodisperse polylactide microspheres	Proceedings of Microsymposi um of Prague Meetings on macromolecul es			2008
富田恵介, 小野 努	マクロモノマー分散共 重合による単分散ヘア 粒子の調製	第61回コロイ ドおよび界面 化学討論会要 旨集			2008
村中誠, 小野努	分散重合における単分 散ポリラクチドミクロ スフェアの粒径制御	第61回コロイ ドおよび界面 化学討論会要 旨集			2008
安川政宏, 神尾 英治, 小野努,	水性二相系を利用した W/W/Oエマルションの 調製	化学工学会第 40回秋季大会 講演要旨集			2008
廣田健, 村中誠, 小野努, 阪田功	光線力学的治療に有効 なポルフィリン内封ナ ノ粒子の開発	化学工学会第 40回秋季大会 講演要旨集			2008

安川政宏, 神尾英治, 小野努	水性二相系を利用したW/W/Oエマルジョンの調製	第15回高分子ミクロスフェア討論会講演要旨集			2008
大浦浩平, 久保田潤, 小野努	界面活性 TEMPO 誘導体を利用した不均一系重合	第 15 回高分子ミクロスフェア討論会講演要旨集			2008
安川政宏, 小野努, 木村幸敬, 神尾英治	水溶性高分子による相分離を利用した複合エマルジョンの調製	高分子材料のための俯瞰的シンポジウム要旨集			2008
廣田健, 村中誠, 小野努, 木村幸敬, 白石太朗, 大河原賢一, 檜垣和孝, 木村聰城郎	ポルフィリン内封ナノ粒子の開発と光線力学的治療への応用	高分子材料のための俯瞰的シンポジウム要旨集			2008
H. Kakuta, K. Sasaki, K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morohashi, K. Morishita	Rexinoid compound having alkoxy group	PCT/JP2008/53240			2008

Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats

Jun-ichi Yokoe^{a,b}, Shiho Sakuragi^a, Kayoko Yamamoto^a, Takuya Teragaki^b, Ken-ichi Ogawara^b, Kazutaka Higaki^b, Naohisa Katayama^a, Toshiya Kai^a, Makoto Sato^a, Toshikiro Kimura^{b,*}

^a Pharmaceutical Research Division, NIPRO Corporation, Shiga 525-0055, Japan

^b Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-Naka, Okayama 700-8530, Japan

Received 24 July 2007; received in revised form 3 November 2007; accepted 6 November 2007

Available online 13 November 2007

Abstract

To evaluate the effect of coupling of recombinant human serum albumin (rHSA) onto the surface of poly(ethylene glycol)-modified liposome (PEG liposome) on the *in vivo* disposition characteristics of liposomal doxorubicin (DXR), the pharmacokinetics and tissue distribution of DXR were evaluated after intravenous administration of rHSA-modified PEG (rHSA/PEG) liposomal DXR into tumor-bearing rats. rHSA/PEG liposome prepared using a hetero-bifunctional cross-linker, *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), efficiently encapsulated DXR (over 95%). rHSA/PEG liposomal DXR showed longer blood-circulating property than PEG liposomal DXR and the hepatic and splenic clearances of rHSA/PEG liposomal DXR were significantly smaller than those of PEG liposomal DXR. It was also demonstrated that the disposition of DXR to the heart, one of the organs for DXR-related side-effects, was significantly smaller than free DXR. Furthermore, the tumor accumulation of rHSA/PEG liposomal DXR was significantly larger than that of PEG liposomal DXR. The "therapeutic index", a criterion for therapeutic outcome, for rHSA/PEG liposomal DXR was significantly higher than PEG liposomal DXR. These results clearly indicate that rHSA-conjugation onto the surface of PEG liposome would be a useful approach to increase the effectiveness and safety of PEG liposomal DXR.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Recombinant human serum albumin (rHSA); PEG liposome; Doxorubicin; Tumor-bearing rats; Passive targeting

1. Introduction

Liposomes containing either monosialoganglioside GM₁ (Allen et al., 1989) or polyethylene glycol (PEG) derivatives (Blume and Cevc, 1990; Klibanov et al., 1990; Allen et al., 1991; Maruyama et al., 1992; Woodle and Lasic, 1992; Yuda et al., 1996) are not readily taken up by the macrophages in reticuloendothelial system (RES), and hence remain in the blood circulation for a relatively long period of time. Particularly, PEG-modified liposomes (PEG liposomes) have been utilized as a particulate carrier for anti-tumor therapy due to their long circulation time. Generally, as the capillary permeability of the endothelium in newly vascularized tumors is significantly greater than that of normal organs, long-circulating PEG liposomes are preferentially delivered and accumulated into the

tumors (enhanced permeability and retention (EPR) effect), which provides a great opportunity for passive targeting of liposomal anticancer agents into tumor tissues (Maeda et al., 2000; Luigi et al., 2003).

Doxorubicin hydrochloride (DXR) is the most commonly used anthracycline and is one of the most active agents in the treatment of breast cancer. However, it sometimes causes cardiotoxicity, which could lead to congestive heart failure and death (Dresdale et al., 1983; Speth et al., 1988). One of the approaches to avoid DXR-related toxicity is to encapsulate it into appropriate drug carriers, which provides a change in the *in vivo* distribution of DXR, resulting in reduced DXR levels in the heart (Abraham et al., 2005). DXR encapsulated in PEG liposome, known as Doxil in the United States, has revealed an increased therapeutic efficacy and reduced cardiotoxicity compared to free DXR (Working and Dayan, 1996; Gabizon et al., 2003).

In the previous study, we reported that rat serum albumin (RSA)-conjugated PEG liposomes showed the longer circula-

* Corresponding author. Tel.: +81 86 251 7948; fax: +81 86 251 7926.

E-mail address: kimura@pharm.okayama-u.ac.jp (T. Kimura).

tion time than PEG liposomes after intravenous administration into rats (Furumoto et al., 2007), suggesting the potential of the albumin-conjugated PEG liposomes as a suitable carrier for various anticancer drugs. Albumin is one of the endogenous, non-toxic, non-immunogenic and relatively hydrophilic proteins in the body. Its introduction on the surface of liposomes reduced the association of serum proteins including some given serum opsonins onto the surface, resulting in the more prolonged circulation time of PEG liposome (Furumoto et al., 2007). However, since the conjugation of rat serum albumin onto PEG liposome with carbodiimide has to be conducted under weakly acidic condition, the pH remote loading method (Mayer et al., 1986; Madden et al., 1990), which can encapsulate DXR into the liposome very efficiently, was not available. In the present study, we changed the method for albumin conjugation in order to encapsulate DXR into liposomes by utilizing the pH remote loading method. *N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyl)dithio) propionate (SPDP) (Carlsson et al., 1978) was selected as a hetero-bifunctional cross-linking agent to couple recombinant human serum albumin (rHSA) onto PEG liposome. This method allowed us to employ the pH remote loading of DXR into the liposome. Then, the effect of rHSA-conjugation to PEG liposome was evaluated in terms of pharmacokinetics and biodistribution of liposomal DXR in Yoshida sarcoma (LY-80)-bearing rats.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Egg phosphatidylcholine (egg PC) was purchased from ASAHI KASEI Chemicals Industry Inc. (Tokyo, Japan). Cholesterol (Chol), doxorubicin hydrochloride (DXR) and daunorubicin hydrochloride were obtained from Wako Pure Chemical Industry Inc. (Osaka, Japan). Dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) and distearoylphosphatidylethanolamine-*N*-[methoxy poly (ethylene glycol)-2000] (PEG-DSPE) were purchased from NOF Inc. (Tokyo). SPDP was purchased from PIERCE Inc. (Rockford, IL, USA). rHSA was gifted from Bipla Inc. (Chitose, Japan).

2.2. Synthesis of PDP-DOPE, as a linker of rHSA-conjugation with liposomes

We synthesized a DOPE derivatized with terminal pyridyldithiopropionate (PDP) groups as previously reported (Barbet et al., 1981; Ishimori et al., 1984). Mixture of DOPE in chloroform and SPDP in methanol (SPDP:DOPE = 67.2:78 molar ratio) were stirred for 2 h under nitrogen gas at room temperature after a small aliquot of triethylamine was added to the mixture. To remove unreacted SPDP, the organic phase was reverse-extracted with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) three times. After the organic solvent was evaporated, the residue was re-dissolved in chloroform to give a final concentration of 10 μ mol PDP-DOPE/mL. Thin layer chromatography (solvent; chloroform:methanol:water = 65:25:4 molar ratio) on silica gel indicated a single spot under UV illumination.

2.3. Preparation of liposomes

Liposomes were prepared according to the following procedures. Lipid mixture (Egg PC:Chol:PEG-DSPE:PDP-DOPE = 61:30:5:4 molar ratio) was dried by rotary evaporator at 40 °C. Two hundred and fifty mM ammonium sulfate solution (pH 5.5) was added to the thin-film of lipids and the mixture was hydrated at 60 °C. The resultant suspension was extruded at least 10 times through polycarbonate membranes of 100 nm pore size (Whatman plc., Brentford, UK). External solution was replaced with PBS (pH 8.0) by gel filtration with a Sephadex G-25 column (PD-10, GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK).

DXR was encapsulated into liposome using the pH remote loading method (Bolotin et al., 1994). DXR was dissolved at 7 mg/mL in PBS (pH 8.0), and then, immediately mixed with liposomal suspension and incubated at 60 °C for 1 h. Non-encapsulated DXR was removed with a PD-10 column equilibrated with PBS (pH 8.0). The extent of DXR encapsulation was determined by measuring liposomal DXR amount by HPLC method as described below.

2.4. Coupling of PDP-rHSA to liposomes

SPDP in methanol was added to rHSA dissolved in PBS (SPDP:rHSA = 20:1 molar ratio) under nitrogen gas and the mixture was incubated at room temperature for 30 min. Excess of SPDP was then removed by Sepharose CL-6B column (Bio-Rad, Emeryville, CA) equilibrated with acetate buffer (pH 4.5). PDP-rHSA was incubated with dithiothreitol (DTT) (PDP-rHSA:DTT = 1:250 molar ratio) for 20 min at room temperature and the reaction mixture was applied to a Sepharose CL-6B column equilibrated with PBS (pH 8.0) to remove unreacted DTT. The activated rHSA in the elution was dropped to liposomal suspensions and the mixture was left at least for 18 h at room temperature under nitrogen gas with gentle stirring. Unreacted rHSA was removed by Sepharose CL-6B column equilibrated with PBS (pH 8.0). As a control, "PEG liposome" was also prepared by coupling cysteine instead of rHSA.

2.5. Physicochemical characterization of rHSA-conjugated PEG liposomes (rHSA/PEG liposomes) encapsulating DXR

The diameter of the liposomes was determined by light-scattering spectroscopy using a NICOMP zls-370 (Particle Sizing System, Santa Barbara, CA). Lipid and rHSA amounts were estimated by using Phospholipid B test Wako and albumin test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Osaka), respectively. Each liposome sample was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as previously reported (Furumoto et al., 2007).

In vitro stability of liposome encapsulating DXR was tested as follows: DXR-encapsulated liposomal suspensions were incubated with the same volume of rat plasma at 37 °C for 2 h. Then, the released DXR was separated by the Sepharose CL-6B column and was determined spectrofluorometrically (Ex = 500 nm, Em = 550 nm).

2.6. Determination of the amount of serum proteins associated with liposomes

Liposomes were incubated in rat serum (liposomal suspension:serum = 1:1, v/v) for 20 min at 37 °C, and subsequently bulk serum proteins were removed by Sepharose CL-4B column (Bio-Rad, Emeryville, CA). The amount of serum proteins associated with liposomes was calculated by subtracting the amount of rHSA coupled with liposomes from the amount of total protein quantified by Lowry's method (Lowry et al., 1951).

2.7. Animals

Male Donryu rats weighing 200–280 g (Charles River Laboratories Inc., Yokohama, Japan) were used throughout the present study. Rats were maintained at 23 °C and 55% of humidity with free access to standard rat food and water. Our investigations were performed after approval by our local ethical committee at Nipro Corporation and Okayama University, and in accordance with Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication #85-23).

2.8. In vivo disposition experiments

LY-80, rat ascites sarcoma cell line was kindly provided from Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University (Sendai, Japan). Rats were subcutaneously inoculated into the thigh with 1.0×10^6 LY-80 cells in a volume of 0.1 mL. Liposomal DXR or free DXR was intravenously injected at 2.0 mg/kg as DXR around 7 days after the tumor inoculation, when the tumor grew up to about 600 mm³ in volume. Then, blood samples were periodically taken from the cannulated jugular vein. Blood samples (0.2 mL) were centrifuged immediately at $4000 \times g$ for 5 min and the obtained plasma samples were kept at -20 °C until analysis. Tissue distribution studies were conducted as follows. At 3 h after intravenous injection, organs (liver, spleen, heart and tumor) were excised, rinsed with PBS and weighed. All tissues were stored at -20 °C until analysis.

2.9. Analytical method

DXR was extracted from plasma and tissue samples as previously reported (Bally et al., 1990; Embree et al., 1993). In brief, 0.1 mL of plasma was added to 0.9 mL of saturated ammonium sulfate (pH 4.0 buffered saline) with daunorubicin, an internal standard. Subsequently, the sample was extracted with 2 mL of chloroform/isopropanol (1:1, v/v). Following vigorous mixing, $1600 \times g$ -centrifugation and the evaporation of organic phase, the residue was re-dissolved in HPLC mobile phase. In the case of tissue samples, after each tissue was homogenized with PBS (pH 7.4) (3.0 g/mL), 1 mL of the homogenate was subjected to the same procedure used for plasma samples.

The HPLC system was composed of LC-10AS pump, SIL-10A autosampler, RF-10A fluorescence detector (Shimadzu, Kyoto, Japan) set at $\lambda_{\text{ex}} = 500$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 550$ nm. An ODS column (5C₁₈, 150 mm \times 4.6 mm i.d., Nacalai Tesque, Inc., Kyoto)

was used at room temperature. The mobile phase was 1/15 M KH₂PO₄:CH₃CN = 75:25 (v/v, pH 4.16, adjusted with H₃PO₄), which was delivered at 1.0 mL/min. The coefficient of variation (CV) for standard curves ranged from 2.3 to 5.6 and the squared correlation coefficient was over 0.99.

2.10. Pharmacokinetic analysis

Plasma concentrations of DXR (C_p) versus time curves were analyzed by Eq. (1) using the non-linear least-square regression program MULTI (Yamaoka et al., 1981)

$$C_p = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} \quad (1)$$

The area under the plasma concentration–time curve (AUC) was calculated by the following equation:

$$\text{AUC} = \int_0^{\infty} C_p dt \quad (t = \infty) \quad (2)$$

Tissue clearance (CL_{tissue}) was calculated by the following equation:

$$CL_{\text{tissue}} = \frac{X_0^t}{\text{AUC}_0^t} \quad (t = 3 \text{ h}) \quad (3)$$

where AUC_0^t means AUC value from 0 to time t , and X_0^t represents the amount of liposomes in a tissue at time t .

2.11. Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm S.D. Analysis of variance (ANOVA) was used to test the statistical significance of differences among groups. Statistical significance in the difference of the means was evaluated by using Student's t -test or Dunnett's test for the single or multiple comparisons of experimental groups, respectively.

3. Results

Several physicochemical characteristics were evaluated for DXR-encapsulated rHSA/PEG liposome and PEG liposome. The average diameters of DXR-encapsulated rHSA/PEG and PEG liposomes were 94.4 ± 6.4 and 95.5 ± 8.1 nm, respectively. DXR encapsulation efficiencies were $97.4 \pm 1.4\%$ and $95.8 \pm 2.1\%$ for rHSA/PEG liposome and PEG liposome, respectively. The amount of rHSA conjugated onto the surface of PEG liposome was $5.3 \pm 1.6 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ total lipid. SDS-PAGE analysis under non-reducing condition revealed that rHSA coupled onto the surface of liposome was exclusively in a monomeric form (data not shown). The release of DXR from the two PEG liposomal preparations was evaluated in an in vitro study for 2 h at 37 °C. The released fraction of DXR was $2.3 \pm 2.6\%$ or $9.3 \pm 5.4\%$ for rHSA/PEG or PEG liposome, respectively.

The in vivo disposition of DXR was evaluated after intravenous injection of free DXR, PEG liposomal DXR or rHSA/PEG liposomal DXR into tumor-bearing rats at a dose of 2.0 mg/kg as DXR. The plasma concentration–time curves

Table 1
Pharmacokinetic parameters of DXR after intravenous administration of free DXR, PEG liposomal DXR or rHSA/PEG liposomal DXR to tumor-bearing rats

	AUC ($\mu\text{g h/mL}$)	CL _{total} (mL/h)	V _d (mL)	k _{el} (h ⁻¹)
Free DXR	4.52 \pm 0.69	131.0 \pm 16.1	27.8 \pm 5.5	4.86 \pm 1.5
PEG liposomal DXR	33.8 \pm 2.8 ^{††}	17.9 \pm 1.0 ^{††}	19.5 \pm 4.4 [†]	0.95 \pm 0.17 ^{††}
rHSA/PEG liposomal DXR	89.7 \pm 12.9 ^{*††}	7.0 \pm 1.2 ^{*††}	14.9 \pm 0.9 [†]	0.47 \pm 0.08 ^{*†}

Each preparation was dosed at 2.0 mg/kg as DXR. AUC, area under the plasma concentration–time curve; CL_{total}, total clearance; V_d, apparent distribution volume; and k_{el}, elimination rate constant, were calculated based on two-compartment model. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments. **p* < 0.05, compared with PEG liposomal DXR. †*p* < 0.05; ††*p* < 0.01, compared with free DXR.

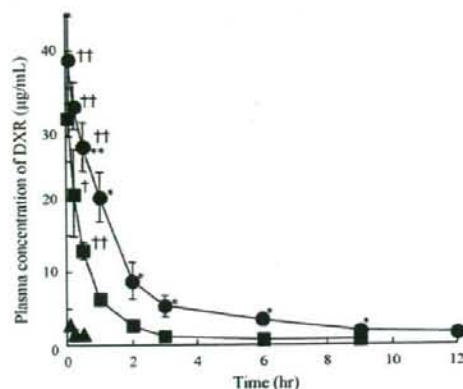


Fig. 1. Plasma concentration–time profiles of DXR after intravenous administration of free DXR, PEG liposomal DXR or rHSA/PEG liposomal DXR to tumor-bearing rats. Each preparation was dosed at 2.0 mg/kg as DXR. Keys: (●) rHSA/PEG liposomal DXR; (■) PEG liposomal DXR; (▲) free DXR. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01, compared with PEG liposomal DXR. †*p* < 0.05; ††*p* < 0.01, compared with free DXR.

of DXR after intravenous administration of each preparation were shown in Fig. 1 and pharmacokinetic parameters of DXR were summarized in Table 1. Fig. 1 clearly shows that the injection of rHSA/PEG liposomal DXR exhibited much higher plasma concentrations of DXR compared with free DXR injection, and moreover significantly higher than the injection of PEG liposomal DXR. AUC of DXR for rHSA/PEG liposome (89.7 \pm 12.9 $\mu\text{g h/mL}$) was significantly larger than that for PEG liposome (33.8 \pm 2.8 $\mu\text{g h/mL}$), but both values of AUC were

extensively larger than that for free DXR (4.52 \pm 0.69 $\mu\text{g h/mL}$). Total body clearance (CL_{total}), distribution volume (V_d) and elimination rate constant (k_{el}) of DXR for both PEG liposomal preparations were significantly smaller than those for free DXR. Furthermore, rHSA/PEG liposome provided significantly smaller CL_{total} and k_{el} of DXR than PEG liposome. These results clearly indicate that rHSA-conjugation prolongs the residence time of PEG liposomal DXR in blood circulation.

In the in vivo disposition study, the distribution of DXR after intravenous administration of each preparation was investigated for liver, spleen and heart (Fig. 2), because liver and spleen are main organs for liposome disposition and cardiotoxicity is a critical side-effect of DXR. At 3 h after injection, distribution of DXR into RES was larger for both PEG liposomal preparation than that for free DXR, but the hepatic and splenic clearances were remarkably smaller for both liposome preparations than that for free DXR, suggesting that rHSA/PEG and PEG liposomal preparations would suppress and delay the uptake of DXR into RES. Furthermore, it was revealed that the hepatic and splenic clearances of DXR for rHSA/PEG liposome were significantly smaller than those for PEG liposome, suggesting that the affinity of rHSA/PEG liposome to these organs would be less than PEG liposome. In addition, PEG liposomal preparations significantly suppressed the distribution of DXR into heart compared with free DXR, although there was no significant difference between rHSA/PEG liposome and PEG liposome (Figs. 2 and 3).

To obtain some clue to explain the reason for the lower hepatic and splenic clearances of rHSA/PEG liposomal DXR than PEG liposomal DXR, we measured the amount of serum proteins associated onto the surface of rHSA/PEG or PEG liposomes (Fig. 3). The result clearly demonstrated that the amount

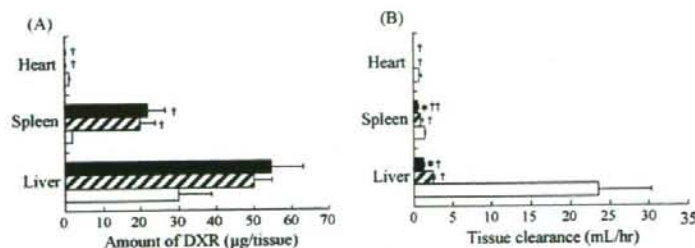


Fig. 2. Tissue distribution of DXR after intravenous administration of free DXR, PEG liposomal DXR or rHSA/PEG liposomal DXR to tumor-bearing rats. (A) Distributed amount of DXR at 3 h after intravenous administration. (B) Tissue clearance calculated according to Eq. (3). Each preparation was dosed at 2.0 mg/kg as DXR. Keys: (□) free DXR; (■) PEG liposomal DXR; (▨) rHSA/PEG liposomal DXR. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments. **p* < 0.05, compared with PEG liposomal DXR in each tissue. †*p* < 0.05; ††*p* < 0.01, compared with free DXR in each tissue.

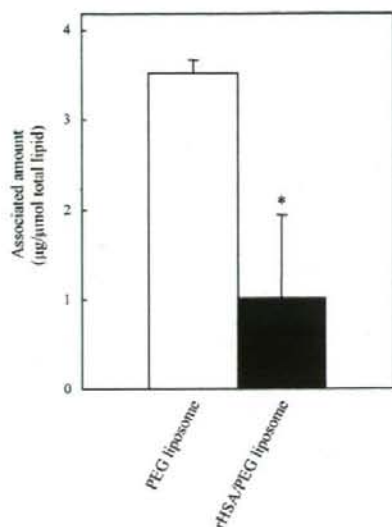


Fig. 3. Amount of serum proteins associated on surface of PEG liposome and rHSA/PEG liposome prepared by SPDP method. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, compared with PEG liposome. The amount of serum proteins associated with rHSA/PEG liposome was calculated by subtracting the amount of rHSA coupled with liposomes from the total protein amount measured.

of associated serum proteins was significantly reduced by the rHSA-conjugation.

Next, we evaluated the disposition of DXR into tumor tissue at 3 h after intravenous administration (Fig. 4). Significantly increased tumor distribution of DXR was observed for both rHSA/PEG and PEG liposomal preparations compared with free DXR. Furthermore, it should be noted that the amount of DXR in tumor was significantly larger for rHSA/PEG liposome than PEG liposome, demonstrating the usefulness of rHSA-conjugation onto PEG liposome for the better DXR delivery into tumor tissues.

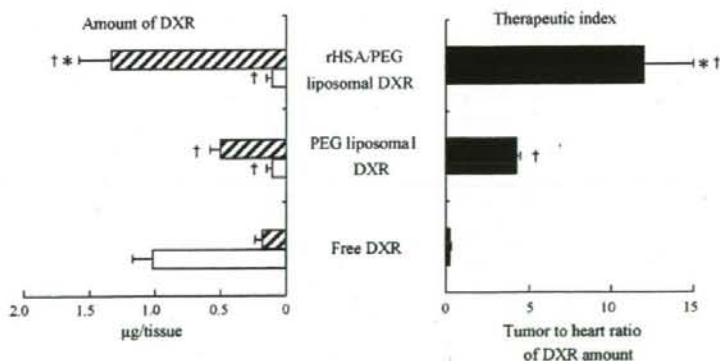


Fig. 4. Amounts of DXR in tumor and heart at 3 h (left) and therapeutic index (right) of free DXR, PEG liposomal DXR or rHSA/PEG liposomal DXR after intravenous administration to tumor-bearing rats. Each preparation was dosed at 2.0 mg/kg as DXR. Therapeutic index was calculated as the tumor to heart ratio of DXR amount. Keys: (▨) DXR amount in the tumor, (□) DXR amount in the heart; (■) therapeutic index of each formulation. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, compared with PEG liposomal DXR. † $p < 0.05$, compared with free DXR.

The therapeutic outcome of DXR would be evaluated by the balance between its anti-tumor effect and side-effect. Therefore, as a criterion for therapeutic outcome, the therapeutic index, tumor to heart ratio of DXR amount, was calculated for both PEG liposomal preparations and free DXR (Fig. 4). The therapeutic index of rHSA/PEG liposomal DXR was the largest among the three preparations, although PEG liposomal DXR was also significantly better than free DXR. This result clearly demonstrates that rHSA/PEG liposomal DXR would provide better EPR effect for tumor tissues than PEG liposomal DXR.

4. Discussion

Long-circulating particles are promising carriers for passive targeting of drugs into tumors or inflamed tissues, where the integrity of the endothelial barrier is perturbed, via EPR effect (Gabizon and Papahadjopoulos, 1992; Jang et al., 2003). In this study, we tried to evaluate the pharmacokinetics and biodistribution of DXR encapsulated into rHSA-conjugated PEG liposome in tumor-bearing rats.

Several factors such as particle size, charge and lipid composition of liposome have been reported to influence the in vivo fate of liposomes after intravenous administration in rats (Gabizon et al., 1993; Harashima et al., 2002). Among them, the size of liposome is one of the most important factors to influence the EPR effect-driven tumor disposition and the liposomes with the diameter of less than 150 nm are reported to be suitable for the efficient delivery (Harashima and Kiwada, 1996; Drummond et al., 1999; Takeuchi et al., 2001). Therefore, we decided to prepare liposomes with a diameter of 100 nm.

In our previous study, we clearly demonstrated that RSA-conjugated PEG liposome (RSA/PEG liposome), prepared by using carbodiimide, prolonged the blood circulation time of PEG liposome after intravenous administration in rats (Furumoto et al., 2007). Carbodiimide has been widely used as carboxyl- and amine-reactive cross-linker to prepare immunoliposomes (Endoh et al., 1981), polymer-protein conjugates (Dilgimen et al., 2001) and immunomicrospheres (MacAdam et al., 2000).