

その有効性について研究を進めてきた。具体的にはファージライブラリーを利用して同定した腫瘍新生血管特異的ペプチド(Ala-Pro-Arg-Pro-Gly: APRPG)をPEG鎖の先端に提示した粒子径約100~150nmのAPRPG-PEG修飾リボソームを開発した¹⁰⁾。このAPRPG-PEG修飾リボソームに抗癌剤としてDOXを封入した製剤は、乏血管性のヒト膵臓癌同所移植モデル等で高い治療効果を示す事を明らかにした⁶⁾。腫瘍新生血管標的化リボソームに関して蓄積してきた研究成果については、これまでも原著論文や総説として纏めているので、ご興味のある方は参照されたい⁷⁻¹⁰⁾。最近の研究成果としては以下に紹介する“dual-targeting”という新しい標的化戦略の有効性を証明した¹¹⁾。

これまでリボソームを始めとするナノ粒子のターゲットングには、単一のリガンドペプチドや抗体などが用いられてきた。しかし、リボソームの表面には複数種のリガンドを効率的に配置する事が可能であり、標的分子の異なるリガンド修飾により、協同的作用が誘起されると考えられる。そこで、我々は複数種の新生血管標的化ペプチドをリボソーム膜表面に修飾する事により、より強力な癌治療効果が得られるかどうかを検討した。新生血管標的化ペプチドとしては、前述の

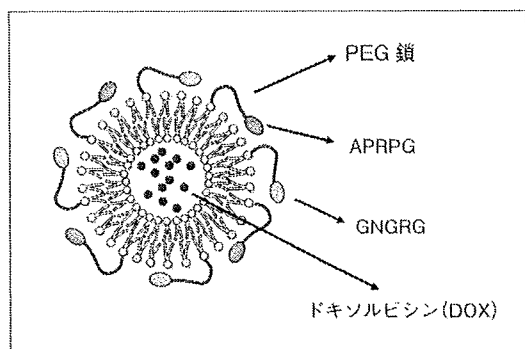


図2. 癌新生血管を標的とした“Dual-targeting”リボソームの模式図

標的分子の異なる2種の新生血管標的化ペプチド(APRPGおよびNGR)をPEGリボソームに修飾した。リボソーム内部にはDOXを封入し、“dual-targeting”が優れた癌治療効果をもたらす事を明らかにした。

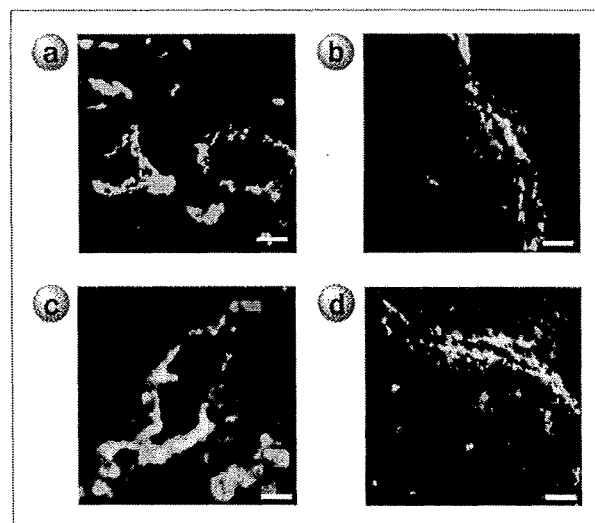


図3. “Dual-targeting”リボソームの癌組織内分布

Colon26 NL-17大腸癌をマウスの皮下に移植し、10日後にDilで蛍光標識した各リボソーム(a: PEGリボソーム, b: APRPGリボソーム, c: NGRリボソーム, d: Dual-targeting (APRPG+NGR)リボソーム)を尾静脈内投与した。投与3時間後に癌組織切片を作成し、血管内皮細胞を抗CD31抗体によって蛍光免疫染色した。赤色で示された部分がリボソームの局在、緑色で示された部分が血管内皮細胞を表わしている(scale bar: 20μm)。Dual-targetingリボソームは黄色の部分が多く、単一ペプチドで修飾したリボソームと比較して新生血管への標的化効果が高い様子が観察された。(文献11より改変)

APRPGペプチドとPastorinoらが同定したAsn-Gly-Arg(NGR)ペプチド¹²⁾を用いた(図2)。その結果、2種のペプチドを修飾したdual-targetingリボソームは、対照の単一ペプチド修飾リボソームと比較し、新生血管内皮細胞に高い親和性を示した(図3)¹¹⁾。またDOXを内封したdual-targetingリボソームは、担癌マウスにおいて優れた腫瘍増殖抑制効果と延命効果を示した(図4)¹¹⁾。これらの結果より、新規標的化戦略である“dual-targeting”は、ナノ粒子の標的細胞に対する親和性を上昇させ、より高い治療効果をもたらすと考えられる。この“dual-targeting”の戦略は癌以外の疾患にも応用可能な標的化戦略である。

核酸医薬におけるリボソーム

これまで、癌などの難治性疾患や遺伝性疾患を対象とした遺伝子治療の研究が、基礎と臨床の両者で実施

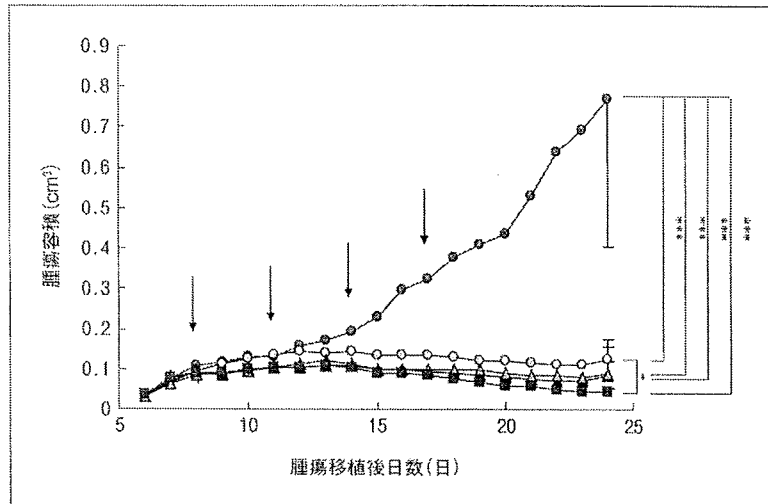


図4. “Dual-targeting” リポソームの癌治療効果

Colon26 NL-17 大腸癌を移植したマウスを用いて “dual-targeting” リポソームの癌治療効果を検討した。無治療群として PBS 溶液 (●), 治療群としては PEG リポソーム (○), APRPG リポソーム (▲), NGR リポソーム (△), そして dual-targeting リポソーム (■) を投与した。投与スケジュールは, Colon26 NL-17 細胞を皮下移植 8 日後から各サンプルを中 2 日で 4 回, 1 回の投与につき DOX 投与量で 3 mg/kg となるように尾静脈内投与した (矢印が投与日を表わしている)。“dual-targeting” リポソームは最も優れた癌治療効果を示した。
(*: p<0.05, ***: p<0.001). (文献 11 より引用)

されてきたが、アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症などごく一部の疾患を除いて期待されたような効果は、なかなか得られていない。しかし、科学の進歩によって RNA 干渉(RNA interference ; RNAi)という革新的な遺伝子発現制御技術が誕生し、small interfering RNA (siRNA)や microRNA (miRNA)が核酸医薬の主役になる可能性が出てきている。過去には実用化が困難であろうと考えられていた抗体医薬品の市場が拡大を続けているように、核酸医薬においてもブレイクスルーとなるような技術革新、つまり siRNA の登場を機にして実用化が飛躍的に進む可能性がある。siRNA は、細胞内在性の遺伝子発現抑制システムを利用するために、従来のアンチセンス DNA 等の遺伝子制御技術と比較して非常に低濃度で選択的に遺伝子発現を抑制できる事が知られている。医薬品シーズとしての期待が大きく、企業における創薬研究も盛んである。しかし、siRNA は RNase によって体内で速やかに分解される事や細胞膜をほとんど透過しない事などから、siRNA を薬にするためには DDS 技術が不可欠となる。

siRNA を用いた RNA 干渉の特徴を極力活かせるベクターとして我々が注目しているのが非ウイルスベクターであり、リポソームがその 1 つである。研究用

試薬としては、すでに多くのカチオニックリポソームが RNA 干渉実験用に市販されている。RNA 干渉を引き起こす方法としては、ウイルスやプラスミド DNA を用いた遺伝子導入により short hairpin RNA (shRNA)を発現させる方法もあるが、siRNA を“単純に載せる”事ができるのは、非ウイルスベクターである。siRNA が一般的な医薬品と同様に、投与量や投与方法によってその効果や副作用を制御できるのに対し、shRNA の場合はそれらに加えて遺伝子発現の制御が必要になるであろう。また、shRNA が高分子の DNA を核内へデリバリーする必要があるのに対し、siRNA は比較的 low molecular weight であり、しかも細胞質にデリバリーすればよい。当然のことだが、siRNA の場合は遺伝子のどこに組み込まれるか心配する必要がない。更に、siRNA が容易に合成可能な低分子である事は製造技術的な大きなメリットであり、これは実用化に直結する重要な要素である。こうした数々の siRNA の良さを活かせるような非ウイルスベクターの開発が医療応用には欠かせない。すなわち siRNA 医薬品の開発においては、治療標的分子はもちろんのこと、siRNA デリバリーシステムの開発が成否の鍵となる。

In vitro で siRNA を細胞に導入する場合には、市販の研究用試薬で十分な事が多いが、治療目的となる



とクリアしなければならないハードルが飛躍的に高くなる。生体において標的組織に必要な量の siRNA を送達し、十分な治療効果を得るだけの遺伝子ノックダウンを実現するベクターには、高い導入効率、安定性、細胞選択性、安全性等が要求される。そこで我々は、siRNA の医療応用を念頭におき、導入ベクターとしてポリカチオンリポソーム (polycation liposomes ; PCL) の開発を進めてきた¹³⁾⁻¹⁵⁾。我々は、これまでに PCL がポリカチオンおよびカチオニックリポソームの両者の利点を併せ持つ、優れた siRNA 導入ベクターである事を明らかにしてきた¹⁴⁾。PCL は、カチオニックリポソームが持つ細胞内移行促進効果とポリカチオンが持つプロトンスポンジ効果(エンドソームから細胞質への核酸放出効果)によって優れたノックダウン効率を示す事が示唆されている。近年では PCL のポリカチオン部分について siRNA 導入に適した構造を探索し、新しい素材の開発を進めている。siRNA 導入ベクターに関する我々の研究成果の一部は既に論文化されているので、ご興味のある方は参照されたい¹⁴⁾¹⁵⁾。ところで、PCL は一般のリポソームと同様、生体内安定性を向上するための PEG 修飾や標的細胞への特異性を付与するためのリガンド修飾等が容易である。従って、PCL は全身性投与(静脈内投与)を目的とした治療用ベクターとしても製剤設計が可能である。我々は、痛新生血管を標的とした siRNA ベクターとして、siRNA を搭載した PCL の表面を PEG と新生血管標的化ペプチドで修飾したベクターを開発し、動物実験において静脈内投与による siRNA デリバリーについて報告してきた。

現在、siRNA 医薬品の開発においては、眼の疾患である加齢性黄斑変性症など、局所投与が可能な疾患の方が臨床試験のステージが進んでいる。しかし、siRNA 医薬が抗体医薬のように市場を拡大し、広く医療に貢献するためには全身性投与で治療効果を得るところまで科学技術の進歩が必要であると考えられる。それを実現する可能性のある DDS 技術の 1 つとしてリポソームが挙げられる。

おわりに

本稿では、ここ 5~6 年の間に国内でも承認されるようになったリポソーム医薬品の話題や、次世代のリポソーム製剤の話題を中心に、その最新動向について紹介した。今回は取り上げなかったが、近年のリポソーム応用研究の動向としては、様々な疾患領域への展開が目覚ましい事が挙げられる。現在でも癌治療薬開発におけるリポソーム研究が多いのは変わらないが、国内では循環器領域や眼科領域などでの応用研究の進展が目立っている¹⁶⁾(循環器領域での DDS は『血管医学』Vol.10 No.3 p73-77 の南野先生の稿を参照)。また、メディカルエレクトロニクスとリポソームを組み合わせた研究も、臨床応用への期待が大きい(本誌の小玉先生の稿 p00 を参照)。その他としては、リポソーム技術を利用した人工赤血球や人工血小板のような人工血液成分に関する研究も、実用化が期待されている分野である。

本稿で述べてきたように、リポソーム技術は実際に医療に貢献する事のできる、いわゆるナノテクノロジーであるが、ほんの少し前までは国内でリポソームが薬になるのか、懐疑的な見方もあったように思う。動物実験で非常にいいデータを出してもなかなか医療への貢献に繋がらない、そのような歯がゆさを経験してきた DDS 研究者は少なくないはずである。現実問題として、科学的根拠とは関係ない知的財産権や薬価の問題も絡んで実用化が難しかった側面もあると思う。しかし、ようやく国内においてもリポソーム医薬品が医療に貢献するようになり、リポソームの医療応用の機運が高まりつつある。次世代医薬品として期待が大きい siRNA 医薬に DDS 技術が欠かせない事も後押ししているかもしれない。今後は、日本発のリポソーム医薬品の誕生に期待したいところであり、我々の研究がそれに少しでも寄与できれば幸甚であると考えている。

◎文献

- 1) リポソーム応用の新展開～人工細胞の開発に向けて～(秋吉一成, 辻井 薫 監修). 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京, 2005
- 2) Matsumura Y, Maeda H : A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : Mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res* **46** : 6387-6392, 1986
- 3) Maeda N, Miyazawa S, Shimizu K, et al : Enhancement of anticancer activity in antineovascular therapy is based on the intratumoral distribution of the active targeting carrier for anticancer drugs. *Biol Pharm Bull* **29** : 1936-1940, 2006
- 4) Oku N, Asai T, Watanabe K, et al : Anti-neovascular therapy using novel peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* **21** : 2662-2669, 2002
- 5) Maeda N, Takeuchi Y, Takada M, et al : Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome. *J Control Release* **100** : 41-52, 2004
- 6) Yonezawa S, Asai T, Oku N : Effective tumor regression by anti-neovascular therapy in hypovascular orthotopic pancreatic tumor model. *J Control Release* **118** : 303-309, 2007
- 7) Shimizu K, Asai T, Oku N : Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic therapy. *Expert Opin Ther Targets* **9** : 63-76, 2005
- 8) 浅井知浩 : 腫瘍新生血管標的化リポソームの新展開. 薬剤学 **65** : 169-174, 2005
- 9) 浅井知浩, 奥 直人 : リポソーム応用の新展開. 最新医学 **61** : 1084-1091, 2006
- 10) 浅井知浩, 米澤 正, 奥 直人 : 腫瘍新生血管標的化リポソーム. *Mebio Oncology* **4** : 48-57, 2007
- 11) Murase Y, Asai T, Katanasaka Y, et al : A novel DDS strategy. "dual-targeting", and its application for antineovascular therapy. *Cancer Lett* : 2009 (Epub ahead of print)
- 12) Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, et al : Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy. *Cancer Res* **63** : 7400-7409, 2003
- 13) Sugiyama M, Matsuura M, Takeuchi Y, et al : Possible mechanism of polycation liposome (PCL)-mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* **1660** : 24-30, 2004
- 14) Asai T, Suzuki Y, Matsushita S, et al : Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown. *Biochem Biophys Res Commun* **368** : 243-248, 2008
- 15) Hatanaka K, Shimizu K, Asai T, Oku N : Antineovascular gene therapy by Ago2 knockdown. *Yakugaku Zasshi* **128** : 1567-1575, 2008
- 16) Takahama H, Minamino T, Asanuma H, et al : Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J Am Coll Cardiol* **53** : 709-717, 2009

6. ぶどう膜炎治療におけるドラッグデリバリーシステムの可能性

— The potentiality of DDS in uveitis treatment —

真 下 永* 黒田 俊一**

はじめに

ぶどう膜炎では少なからぬ症例で慢性に経過し、長期にわたりステロイドを含む免疫抑制剤の全身投与が行われる場合がある。これらの症例では免疫抑制剤による全身への副作用がしばしば問題となる。

薬物の効果は体内に投与された薬物が、目的とする標的部位に到達することによって発現する。免疫抑制剤の全身投与では、体内に投与された薬物は目的とする標的部位にまで効率的に到達することができないばかりか、代謝・排泄を受けたり、ある部位にトラップされたりするので、有効濃度を維持することが困難である。

このため、薬理活性を示すに必要な濃度を全身において維持するために、投与する薬物量は多くなり、副作用が生じてしまう。標的性のある製剤を調製し、標的部位において薬剤が有効濃度に達するように調整すると、このような欠点を克服することができる。

このように「必要なときに、必要な量の薬剤

を、必要とする部位に到達させる」仕組みがドラッグデリバリーシステム (drug delivery system : DDS) である。

実はぶどう膜炎治療においては既にさまざまな局所投与による DDS が存在する。ステロイド剤点眼は非侵襲的に前眼部に薬剤を到達させるための理想的な DDS である。また後眼部に対しても、トリアムシノロンアセトニドのテノン嚢下注射および硝子体注射、ステロイド徐放製剤の眼内インプラント等の DDS があり、ぶどう膜炎治療において有用である。

しかし、これら局所投与による DDS では眼局所の副作用 (易感染性、ステロイド緑内障、白内障) 等の頻度が高く、後眼部に対する治療は患者における侵襲も大きいと考えられる。その適応に対しては慎重に考えざるを得ないのが現状である。また、局所投与故に、全身免疫疾患 (サルコイドーシス、ベーチェット病、原田病等) においては眼以外の炎症部位への治療効果は期待できず、眼局所の消炎も不十分となる症例も存在する。

また、慢性ぶどう膜炎においては長期にわたる治療が必要となり、遺伝子治療が可能となれば有用と考えられる。遺伝子治療においても、いかに必要な時に必要な量の遺伝子を必要とする部位に到達させるか (gene delivery system :

* Hisashi MASHIMO 大阪大学大学院医学系研究科眼科学分野

** Shunichi KURODA 名古屋大学大学院生命農学研究科産業生命工学研究分野

Key words : バイオナノカプセル, ドラッグデリバリーシステム, ぶどう膜炎, bio-nanocapsule, DDS, uveitis

GDS)が重要であるが、ぶどう膜炎治療においてはほぼ未開拓な領域である。

これらのことを踏まえると投与ルートが確保しやすい静脈注射を行うことで炎症病巣における薬物、遺伝子の集積を高め、長期間その効果を維持できるDDS/GDSが可能となれば理想的な炎症抑制療法となることが考えられる。

本項では、そうしたDDSを可能とする「生体内における細胞および組織への薬剤標的化技術(*in vivo targeting*)」を概説するとともに、その技術の中で、筆者らが開発したウイルス法とリポソーム法のハイブリッド型である「バイオナノカプセル法(*bio-nanocapsule*: BNC)」を紹介する。BNC法は、低分子化合物、遺伝子、蛋白質などのさまざまな薬物を包含することができる全く新しいキャリアー(運搬体)であり、今後の医薬品を革新的に変えてゆくと期待されている*in vivo pinpoint drug/gene delivery system*(薬剤および遺伝子の生体内ピンポイント投与システム)のプラットフォーム技術である。次に実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデルに対してこの技術を応用し、DDS製剤としてのBNCの有用性を報告する。

1. *In vivo targeting* を達成する技術

① EPR効果

*In vivo targeting*の実現には、2段階の技術的問題をクリアしないとイケない。①生体内に投与された薬剤(遺伝子を含む)を、血流により目的の臓器および組織に到達させる技術(マクロレベルの標的化技術)と、②臓器および組織内部で正常細胞と目的細胞(*target cells*)を見分けて、目的細胞だけに薬剤を導入、もしくは作動させる技術(ミクロレベルの標的化技術)が必要である。まず、マクロレベルの標的化技術としては、EPR効果(*enhanced permeation and retention effect*)がある。これは、癌組織に含

まれる新生血管の血管壁細胞間隙が正常組織とは異なり100 nmより大きいことから、血流中を循環する直径約100 nmの物質が癌組織内の血管壁外に浸潤して、次第に癌組織に蓄積する現象である。既にリポソーム、高分子ミセルからなる直径100 nmのキャリアーが開発されており、内部に抗癌剤を包含させ、EPR効果により癌組織特異的な抗癌剤の送達に成功している。ぶどう膜炎においても血管壁細胞間隙が拡大している炎症部位で同様の効果が期待できる。実際、生体分解性高分子(ポリ乳酸、ポリグリコール酸ポリマー)から作製したマイクロスフェアにリン酸ベタメタゾンを含むナノステロイドをぶどう膜炎モデル動物に投与し、リン酸ベタメタゾンを炎症部位に集積させることに成功している¹⁾。ただしこうしたキャリアーは血管壁外の組織の特定の細胞を標的化できるわけではない。特に遺伝子の導入においてはこの点が問題となると考えられる。

次にミクロレベルの標的化技術としては、薬剤(遺伝子を含む)を目的細胞のみならず正常細胞にも導入するが、正常細胞では作動させず、目的細胞のみで作動させる技術(図1A, B)や、正常細胞と目的細胞の表層状態の差を見分けて、目的細胞のみに薬剤(遺伝子を含む)を導入する技術〔能動的標的化(*active-targeting*), 図1C〕などがある。なお、後述するBNC技術は、EPR効果以外にさまざまな生体認識分子をキャリアー表面に提示することで能動的標的化を実現している。

② 目的細胞特異的な遺伝子発現技術

欧米で行われている遺伝子治療の現場において使用されている治療用遺伝子のキャリアーは、広範な細胞に感染することができるアデノウイルス、レトロウイルス、HIVウイルス、アデノ随伴ウイルスなどがある。実験的ぶどう膜炎モデルラットにインターロイキン10をアデノウイルスベクターを用いて導入し消炎効果を認め

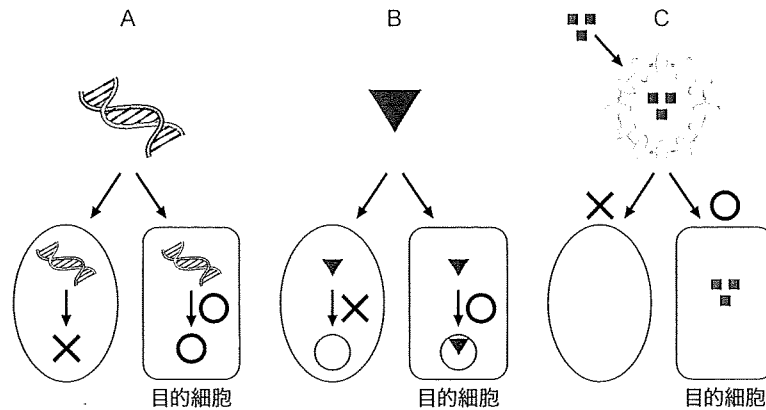


図1 ミクロレベルの標的化技術

- A: 目的細胞特異的な遺伝子発現
 B: 目的細胞特異的な薬剤活性化
 C: 目的細胞特異的な薬剤送達 (能動的標的化(active targeting))

たことが報告されている²⁾。またイギリスやアメリカではアデノ随伴ウイルスを用いた Leber 先天盲に対する遺伝子治療が開始されている³⁾。ただこれらのキャリアーは、生体内において高い感染性を有するので、患部以外の部位に対して望まれない遺伝子導入を行うことがある。つまり宿主細胞域がきわめて広範で能動的な標的化能力はほとんどない。そのために、臨床応用に際しては、たとえ目的細胞以外に治療用遺伝子が導入されても作動しないようにするフェイルセーフの機構が必要である。具体的には、治療用遺伝子の発現ベクターに含まれるプロモーター (promoter) やエンハンサー (enhancer) を目的細胞特異的に作動するように工夫されている (図 1A)。具体的には、albumin promoter および α -1-antitrypsin promoter などが肝臓特異的なプロモーターとして、また、 α -fetoprotein enhancer が肝臓特異的なプロモーターとして *in vivo* 系でも使用可能なことが示されている⁴⁾が、概して発現制御の緩いものが多いことから、現実的にはウイルスベクターと本技術のみで *in vivo* pinpoint gene therapy (生体内の任意の組織および細胞を対象とするピンポイント遺伝子治療) を達成するのは困難と考えられている。

その他に目的細胞特異的な遺伝子発現技術として細胞内シグナル応答性ポリマーがある。目的細胞内のみで遺伝子発現を行うため、すべての細胞に DNA・ポリマー複合体を導入したのち、目的細胞特異的な細胞内シグナルに応答して複合体の安定性を変化させて、DNA を作動可能な状態で目的細胞内に放出する方法が報告された⁵⁾。

④ キャリアーを用いた能動的標的化技術

1) ウイルスベクター法

ウイルスは宿主細胞に感染して自分自身の遺伝子を導入して増幅することから、ウイルスゲノム内に治療用遺伝子を組み込むことで遺伝子キャリアー (別名ウイルスベクター) として、患部に遺伝子を送達させることが広く行われている。細胞内への遺伝子導入効率は、ウイルスの感染機構を利用するため他の遺伝子キャリアーに比べて通常高いのでウイルスベクターの能動的標的化技術の開発が進んでいる。具体的には、センダイウイルスの表面に磁性ナノ粒子を付加して、磁力の作用により組織特異的な導入効率を向上させた報告がある⁶⁾。また、癌細胞を認識するペプチドをバキュロウイルスの表面に提示して、*in vitro* ながら遺伝子を癌細胞特異的に

送達した報告もある⁷⁾。しかし、これらの改変型ウイルスベクターを臨床応用するには、相当高度な生体内標的化技術を実現しないと、依然としてウイルスベクター本来の課題が残る。まず、ウイルスベクターは概して大量生産が困難であり、生産者への感染事故を防ぐ方策も必要なので、医薬品として生産するコストが非常に高くなる。また、ヒトはさまざまなウイルスに感染されているので、投与時にアナフィラキシーショックを起こす可能性が高い。さらに、ウイルスゲノム由来の遺伝子を同時に投与するので、患者の正常な遺伝子情報をかく乱する可能性がある。実際に、ウイルスベクターを利用した臨床応用で白血病の発症例⁸⁾や死亡例⁹⁾の報告がある。

2) 非ウイルスベクター法

上述したウイルス由来の副作用を回避し、飛躍的に安全性を高めるために非ウイルスベクター法が開発された。最も代表的なものはリポソームであり、安全性の向上以外にも、大量生産が容易で、遺伝子から低分子化合物までさまざまな物質を導入可能なことが長所である。しかし、リポソームの細胞内への導入効率は endocytosis によるためウイルスと比較してきわめて低く、また広範な種類の細胞に取り込まれる。

そこで橋田らは炎症血管内皮細胞特異的に発現する E-selectin を標的として、そのリガンドであり白血球の膜表面にも存在するシアリル路易斯 X を結合した標的指向性の高いリポソームを開発し、ぶどう膜炎動物モデルにて薬剤を能動的に炎症部位に集積させることに成功した¹⁰⁾。ただし、生体内における能動的標的化を実現した非ウイルスベクター法はきわめて少ないのが現状である。

リポソーム以外にもさまざまな材料を用いたポリマーが非ウイルスベクター法として使われている。たとえば、DNA と複合体を形成する

カチオン性ポリマーであるキトサン¹¹⁾¹²⁾、ポリエチレンイミン¹³⁾、poly-L-lysine¹⁴⁾¹⁵⁾、などが DNA 導入用キャリアーとして使用されている。これらのキャリアーに細胞および組織特異性を持たせるために、さまざまな工夫がされている。たとえば、ガラクトシル化¹⁶⁾¹⁷⁾やガラクトースへの置換¹⁸⁾による肝細胞への標的化、EGFR 親和性ペプチドとの結合によるヒト癌細胞への標的化¹⁹⁾、なども報告されている。しかしながら、これらのカチオン性ポリマーは核酸には適しているが他の物質に不向きな場合も多く、時々強い細胞毒性を示すことがあり、生体内において非特異的に細胞に取り込まれる性質を有するために標的化の課題が残っている。

3) バイオナノカプセル技術

ウイルスベクターや非ウイルスベクターには、上述したとおり一長一短があり、いまだ決定的な薬剤キャリアーは開発されていない。その中で、われわれのグループが従来のキャリアーの欠点を解決した新たなキャリアー「バイオナノカプセル(BNC)」の開発に成功した。

II. バイオナノカプセル技術

① バイオナノカプセルとは

BNC とは、B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) の外皮蛋白質 (HBV surface antigen : HBsAg) を出芽酵母等の真核生物細胞で発現させた際に宿主由来の小胞体脂質二重膜上に膜蛋白質として存在し、出芽形式でルーメン側に直径約 100 nm の中空粒子を形成したものである (図 2)。HBsAg 蛋白質として、S 蛋白質 (226 アミノ酸残基) の N 末端側に pre-S2 領域 (55 アミノ酸残基) と pre-S1 領域 (108 アミノ酸残基) が付加した L 蛋白質を通常用いている。そのうち、pre-S1 領域の N 末端側約 70 アミノ酸残基にはヒト肝臓特異的なレセプターが存在し、HBV の厳密なヒトおよびチンパンジー肝臓

特異的な感染機構の中心的役割を担っている。このような肝臓選択性は、他のキャリアーがEPR効果によって癌細胞に物質を送達する受動的標的化とは異なり、HBVが本来備えている能動的標的化機構であり、BNCも同機構を引き継いでいる。さらに、BNCには、HBVのようにウイルスのゲノムや遺伝子複製に必要な酵素などが含まれていないため、安全である。実際、BNCは遺伝子組み換え酵母を用いて大量生産される²⁰⁾が、この粒子は既に全世界で20年以上も臨床で使用されてきたB型肝炎ワクチンと同じ構造であるので、BNCを臨床応用する際の毒性や安全性に対する懸念を著しく低減できる。

② バイオナノカプセル内部への物質封入

実際にBNC内部に物質を封入するのは、当初はエレクトロポレーションを用いて物質をBNC内部に封入していたが²¹⁾、BNCを医薬品として開発する場合に大量生産に不向きであることと、封入効率が一定でないことから、現在では一度リポソーム内部に物質を封入してBNCの膜融合活性を利用して融合することによりBNC内部に効率的に物質を封入している(リポソーム融合法)²²⁾。また、リポソームに封入できるものであればすべてBNC内部に移すことができるので、遺伝子、薬剤、蛋白質、siRNAなどの送達にBNCは使用できる。特に、従来不可能であった直径100 nmのポリスチレンビーズや数十 kbpの発現ベクターをBNC内部に封入して、生体内でのピンポイントデリバリーができるようになった。

緑色蛍光蛋白質(GFP)の発現遺伝子を封入したBNCを、ヒト肝臓癌由来細胞株と他組織由来細胞株の培養液中に添加すると、ヒト肝臓癌由来細胞株のみにGFP由来の蛍光を観察することができた²¹⁾。従来のカチオン性リポソームを使用する遺伝子導入試薬と比較すると、単

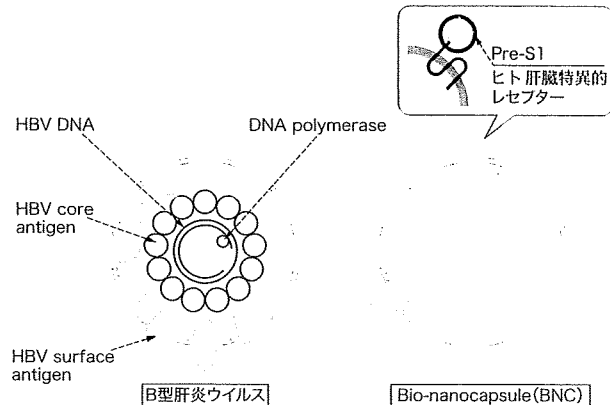


図2 B型肝炎ウイルスと同表面抗原粒子(HBsAg; BNCに相当)

位DNA当たりのGFP発現量は100倍以上であった。これは、BNCがリポソームとは異なりendocytosisに依存して細胞内に送達されるだけでなく、HBV由来の感染機構を保持していることを示している。

③ バイオナノカプセルの再標的化

BNCは主にpre-S1領域によりヒト肝臓細胞を認識する。同領域をさまざまな生体認識分子に置換することで、他の細胞や組織を標的にすることが可能である。生体認識分子としては、抗体、糖鎖、サイトカイン、同レセプターおよびボーミングペプチド(生体内で組織特異性を持つ短鎖ペプチド)などさまざまなものが考えられ、その臨床応用に向けて研究が進んでいる(図3)。なかでも抗体は多彩な分子を認識することができるので、BNCの再標的化用の生体認識分子としては最適である。われわれは*Staphylococcus aureus*由来のprotein A由来のIgG Fc結合ドメインであるZドメインを2量体にしたZZドメインをpre-S1領域と交換した、ZZドメイン提示型BNCの遺伝子組み換え酵母による大量生産に成功した。このZZ提示型BNCは、抗体と共存させると、自動的に抗体提示型BNCとなる(図3)。

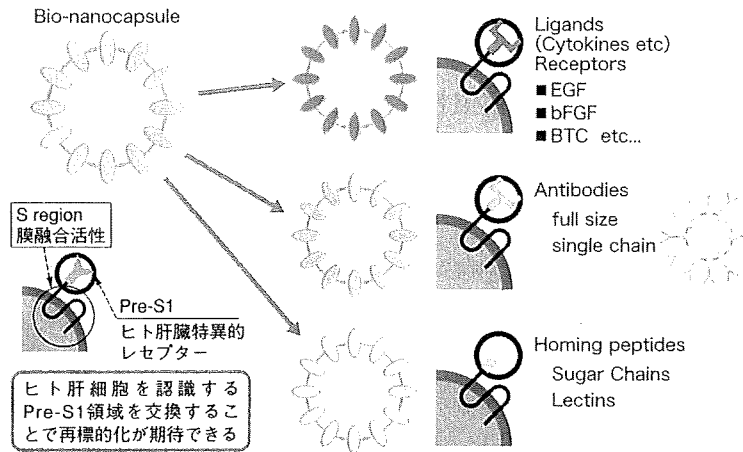


図 3

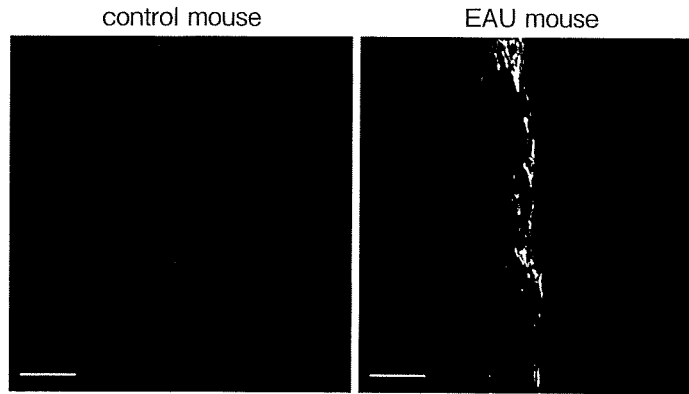


図 4 EAU マウス網膜での P-selectin の発現
FITC : P-selectin, Evans blue : 血管内腔

④ ぶどう膜炎治療へのバイオナノカプセルの応用

再標的化した BNC をヒトぶどう膜炎の動物モデルに応用することにより生体内でピンポイントに遺伝子や物質をデリバリーすることに成功した。

1) 実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) と P-selectin の発現

EAU はヒトぶどう膜炎の動物モデルであり、その病態・治療に関する研究はヒトぶどう膜炎の病態解明や新しい治療法の開発に貢献してきた。免疫抑制薬のシクロスポリンも EAU においてその有効性が確認された後、ヒトぶどう膜

炎でも使用されるようになり、現在ではベーチェット病をはじめとする自己免疫性ぶどう膜炎における炎症抑制の有効な治療薬としての立場が確立されている。このように、EAU を使った治療実験は、ヒトぶどう膜炎の治療への応用を期待させる。

EAU の発症機序であるが、EAU を誘導可能な網膜特異抗原を免疫後、所属リンパ節で活性化された抗原特異的 T 細胞が眼内に侵入し、炎症性サイトカインを放出し、マクロファージや好中球が活性化・浸潤し、炎症を起こすと考えられている。眼内の炎症は、汎ぶどう膜炎として現れ、抗原免疫後 10~14 日で結膜充血、

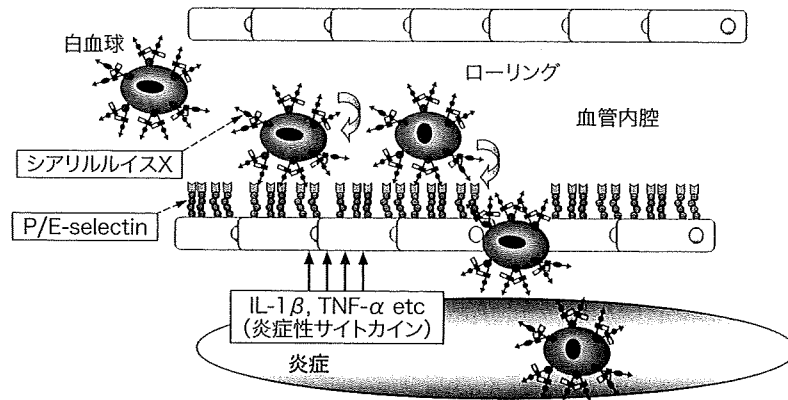


図5 ぶどう膜炎の網膜血管浸潤のメカニズム

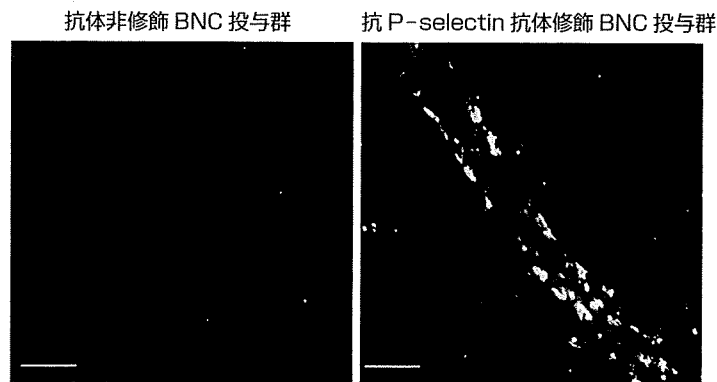


図6 GFP 遺伝子の発現

green : GFP, Evans blue : EUA マウスの血管内腔

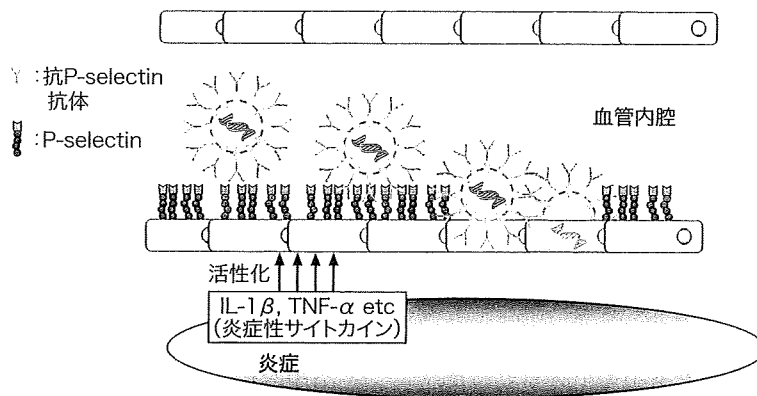


図7 抗 P-selectin 抗体結合 ZZ 提示型 BNC

前房内炎症，網膜血管炎の所見が出現し，数日で炎症はピークに達し，その後，徐々に自然消退することが知られている。またEAUの網膜

静脈の血管内皮にはP-selectin(図4)やE-selectinが発現しており，好中球は表面にはリガンドであるシアリルルイスXがあり，それを

介して血管内皮と接触しローリングを行うようになる(図5)。

2) 抗体提示型バイオナノカプセルを用いた炎症部位の能動的標的化

リポソーム融合法により蛍光物質を封入したZZ提示型BNCと炎症部位に発現している抗P-selectin抗体を、室温で30分間反応させたのち、炎症ピーク時のEAUマウスの尾静脈から投与すると、炎症部位の細胞に蛍光物質が取り込まれていた。さらにGFPを封入した抗P-selectin抗体結合ZZ提示型BNCをEAUマウスに投与した場合も、同様に炎症部位の細胞に蛍光発現を認めた(図6)。これらの結果から抗体提示型バイオナノカプセルを用いることにより薬剤、遺伝子を能動的に標的化できることが*in vivo*で示された(図7)(2008年日本眼炎学会にて報告)。

3) バイオナノカプセルの臨床応用に際しての課題

ここまでBNCのDDS/GDS技術について述べたが、臨床応用に向けて解決すべき問題も多い。BNCはHBsAgのL蛋白質を基本としているため、ヒト免疫系により排除される可能性がある。特に、B型肝炎ワクチン接種者などの抗HBV抗体を持っているヒトにおいては、免疫反応から逃れるステルス化BNCが必要である。われわれは既にB型肝炎ワクチン接種者の体内で増殖するHBVエスケープ変異体の研究成果に基づき、いくつかのアミノ酸置換を加えた改変型BNCを開発し、その低抗原性ならびに高濃度の中和抗体存在下における感染性の保持を確認しており、長期的な治療におけるBNCの使用を可能にする研究も進めている。また、実際BNCにどのような薬剤や遺伝子を内包し、どれだけの量を投与すれば、ぶどう膜炎を長期間にわたって効果的に安全にコントロールできるかを検討していく必要がある。

おわりに

今日、多様なキャリアーの開発が世界中で進み、それに伴いDDS/GDSの進歩が目覚ましい。しかし、その中で*in vivo*で使用できるものは一部であり、*in vivo*で静脈注射によりピンポイントデリバリーに成功したものはBNCを含めごく一部である。BNCをはじめとする能動的標的化を可能とするキャリアーを利用した治療がぶどう膜炎をはじめとする慢性眼疾患の治療の突破口となることを期待したい。

文献

- 1) Sakai T, Kohno H, Ishihara T et al : Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with poly (lactic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate. *Exp Eye Res* 82 : 657-663, 2006
- 2) Fang IM, Lin CP, Yang CH et al : Inhibition of experimental autoimmune anterior uveitis by adenovirus-mediated transfer of the interleukin-10 gene. *J Ocul Pharmacol Ther* 21 : 420-428, 2005
- 3) Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS et al : Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358 : 2231-2239, 2008
- 4) Hafenrichter DG, Ponder KP, Rettinger SD et al : Liver-directed gene therapy : evaluation of liver specific promoter elements. *J Surg Res* 56 : 510-517, 1994
- 5) Katayama Y, Sonoda T, Maeda M : A-polymer micelle responding to the protein kinase A signal. *Macromolecules* 34 : 8569-8573, 2001
- 6) Morishita N, Nakagami H, Morishita R et al : Magnetic nanoparticles with surface modification enhanced gene delivery of HVJ-E vector. *Biochem Biophys Res Commun* 334 : 1121-1126, 2005
- 7) Mäkelä AR, Matilainen H, White DJ et al : Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides. *J Virol* 80 : 6603-6611, 2006
- 8) Marshall E : Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science*

- 298 : 34-35, 2002
- 9) Savulescu J : Harm, ethics committees and the gene therapy death. *J Med Ethics* 27 : 148-150, 2001
 - 10) Hashida N, Ohguro N, Yamazaki N et al : High-efficacy site-directed drug delivery system using sialyl-Lewis X conjugated liposome. *Exp Eye Res* 86 : 138-49, 2008
 - 11) MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J et al : Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Release* 56 : 259-272, 1998
 - 12) Richardson SC, Kolbe HV, Duncan R : Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system : biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int J Pharm* 178 : 231-243, 1999
 - 13) Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA et al : A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo : polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 7297-7301, 1995
 - 14) Oupický D, Howard KA, Konák C et al : Steric stabilization of poly-L-Lysine/DNA complexes by the covalent attachment of semitelechelic poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]. *Bioconj Chem* 11 : 492-501, 2000
 - 15) Bielinska AU, Yen A, Wu HL et al : Application of membrane-based dendrimer/DNA complexes for solid phase transfection in vitro and in vivo. *Biomaterials* 21 : 877-887, 2000
 - 16) Nishikawa M, Ymauchi M, Morimoto K et al : Hepatocyte-targeted in vivo gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic multi-functional gene delivery system. *Gene Ther* 7 : 548-555, 2000
 - 17) Hashida M, Takemura S, Nishikawa M et al : Targeted delivery of plasmid DNA complexed with galactosylated poly (L-lysine). *J Control Release* 53 : 301-310, 1998
 - 18) Nishikawa M, Kamijo A, Fujita T et al : Synthesis and pharmacokinetics of a new liver-specific carrier, glycosylated carboxymethyl-dextran, and its application to drug targeting. *Pharm Res* 10 : 1253-1261, 1993
 - 19) Li Z, Zhao R, Wu X et al : Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *FASEB J* 19 : 1978-1985, 2005
 - 20) Kuroda S, Otaka S, Miyazaki T et al : Hepatitis B virus envelope L protein particles. Synthesis and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, purification and characterization. *J Biol Chem* 267 : 1953-1961, 1992
 - 21) Yamada T, Iwasaki Y, Tada H et al : Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol* 21 : 885-890, 2003
 - 22) Jung JH, Matsuzaki T, Tatematsu K et al : Bio-nanocapsule conjugated with liposomes for *in vivo* pinpoint delivery of various materials. *J Control Release* 126 : 255-264, 2008

*

*

BIO-NANOCAPSULE-LIPOSOME CONJUGATES FOR *IN VIVO* PINPOINT DRUG AND GENE DELIVERY

Takeshi Kasuya,* Joohee Jung,^{*1} Rie Kinoshita,[†] Yasumasa Goh,[†]
Takashi Matsuzaki,* Masumi Iijima,^{*,‡} Nobuo Yoshimoto,^{*,‡}
Katsuyuki Tanizawa,* and Shun'ichi Kuroda^{*,†,‡}

Contents

1. Introduction	148
2. First-Generation Bio-Nanocapsules	149
3. Second-Generation BNCs	150
4. Retargeting of BNC-LP Conjugates	152
5. Overexpression of BNCs in <i>S. cerevisiae</i>	153
5.1. Purification of BNCs by ultracentrifugation (≤ 10 mg protein per lot)	154
5.2. Purification of BNCs using column chromatography	154
5.3. Purification of ZZ-BNC using column chromatography	155
6. Conjugation of BNCs with LPs	155
6.1. Example 1.1: Preparation of BNC-LP conjugates containing DNA (BNC-lipoplex conjugates)	156
6.2. Example 1.2: <i>In vitro</i> transfection with BNC-lipoplex conjugates	156
6.3. Example 1.3: <i>In vivo</i> transfection with BNC-lipoplex conjugates	158
6.4. Example 2.1: Preparation of BNC-LP conjugates containing DOX	158
6.5. Example 2.2: <i>In vitro</i> cytotoxic effects of BNC-LP conjugates containing DOX	159
6.6. Example 2.3: <i>In vivo</i> therapeutic effects of BNC-LP conjugates containing DOX	161

* Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Ibaraki, Osaka, Japan

[†] Beacle Inc., ORIC, Haga, Okayama, Japan

[‡] Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, Japan

¹ Present address: Institute for Innovative Cancer Research, ASAN Medical Center, Pungnap-2, Songpa, Seoul, Korea

7. Preparation of Antibody-Displaying BNC-LP Conjugates	161
8. Preparation of Biotin-Displaying BNC-LP Conjugates	163
9. Concluding Remarks	163
Acknowledgments	164
References	164

Abstract

A bio-nanocapsule (BNC) is an ~ 50 -nm hepatitis B virus (HBV) subviral particle comprising HBV envelope L proteins and a lipid bilayer, and is synthesized in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. When BNCs are administered intravenously in a mouse xenograft model, they can accumulate specifically in human liver-derived tissues and enter cells efficiently by the HBV-derived human liver-specific infection machinery, localized at the outer-membrane pre-S region of the L protein. BNC specificity for the human liver can be altered to other tissues by substituting the pre-S region using targeting molecules (e.g., antibodies, lectins, cytokines). BNCs can spontaneously form complexes with liposomes (LPs) by the membrane fusogenic activity of the pre-S region. LPs containing various therapeutic materials (e.g., chemicals, proteins, DNA, RNA) can therefore be covered with BNCs to form an ~ 150 -nm BNC-LP conjugate. BNC-LP conjugates injected intravenously can deliver incorporated materials to target tissues specifically and efficiently by utilizing the HBV-derived infection machinery. The stability of BNC-LP conjugates in the blood circulation is similar to that of PEGylated LPs. In this chapter, we describe the preparation and *in vivo* application of BNC-LP conjugates, and the potential of BNC-LP conjugates as *in vivo* pinpoint drug delivery systems.

1. INTRODUCTION

Liposomes (LPs) are one of the most promising drug delivery system (DDS) carriers for genes and drugs, and several LP-based medicines have entered clinical use (Lorusso *et al.*, 2007; Markman, 2006; Richardson, 2006; Rosenthal *et al.*, 2002). Most LP-based medicines are nanoscaled. They are used for the delivery of anticancer drugs to carcinomatous lesions by taking advantage of the enhanced permeation and retention effect of solid tumors (Maeda *et al.*, 2000). The blood vasculature in tumors is leaky, because it possesses larger sized pores than the blood vasculature in healthy tissues. A nanomedicine of diameter ~ 100 nm can therefore readily seep out from the blood circulation and accumulate in tumors (“passive targeting”). The major obstacle for passive targeting is the immune system in the liver and spleen, that is, the reticuloendothelial system (RES) in which macrophages (including Kupffer cells) capture opsonized micro- and nanoscaled compounds (Moghimi *et al.*, 2001). To escape the RES, recent LPs have been modified with polyethylene glycol (PEG) (i.e., PEGylated LPs),

thereby enhancing their stability in the blood circulation by avoiding LPs from binding to serum proteins (“opsonization”) (Lasic and Martin, 1995; Moghimi and Szebeni, 2003). PEGylated LPs containing anticancer drugs could dramatically reduce adverse side effects, but several reports have noted that the LP encapsulation of anticancer drugs contribute only to the reduction of side effects, not to the enhancement of therapeutic effects (Hong *et al.*, 1999; Parr *et al.*, 1997). This indicates that modifying LPs for the delivery of drugs to actively target *foci* (“active targeting”) is required.

After attachment onto the cell surface, LPs are usually incorporated within target cells through an endocytotic cascade. Most of the drugs in LPs are degraded in late endosome and lysosome without exhibiting sufficient therapeutic effects. In contrast to LPs, several viral vectors (e.g., adenovirus, adeno-associated virus, lentivirus, retrovirus) are widely used in gene delivery. This is because recombinant viral vectors can efficiently pass across the plasma membrane and deliver their genomic information to the cell nucleus as well as escaping from the endocytotic cascade. These viral vectors may have unexpected severe side effects originating from the viral genome (Marshall, 2002; Savulescu, 2001), but the efficiency of gene delivery is much higher than that of lipoplexes (LP-DNA complexes) (Hana *et al.*, 2006). Taken together, the next generation of LP-based nanomedicines must have the following features: (1) viral genome-free structure; (2) active targeting machinery; (3) escape machinery from the RES; (4) escape machinery from the endosomal degradation pathway; and (5) intracellular targeting machinery.

2. FIRST-GENERATION BIO-NANOCAPSULES

In the process of developing a hepatitis B virus (HBV) vaccine, we succeeded in overexpressing HBV subviral L particles in *Saccharomyces cerevisiae* (Kuroda *et al.*, 1992). The L particle is an ~50-nm hollow capsule comprising HBV envelope L proteins and a lipid bilayer (Yamada *et al.*, 2001). In 2003, we unexpectedly found that the L particles could incorporate genes and drugs by electroporation, and deliver the incorporated materials specifically and efficiently to cell lines (*in vitro*) and tumors (*in vivo*) derived from the human liver (Yamada *et al.*, 2003). We therefore designated the HBV L particle as a “bio-nanocapsule” (BNC) (Yu *et al.*, 2005). The hepatophilic and highly efficient delivery properties of BNCs are considered to be based on the infection mechanism of HBV. BNCs and HBV display the N-terminal half of the outer-membrane pre-S region of L protein (Fig. 8.1), which is postulated to have a pivotal role in the human liver-specific attachment of HBV (Kasuya *et al.*, 2008a,b). We succeeded in the continuous expression (>1 month) of the human blood clotting factor

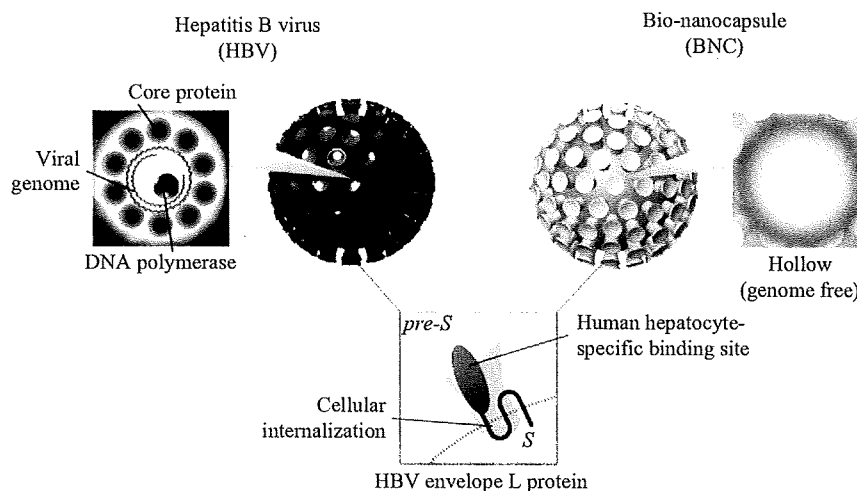


Figure 8.1 HBV and BNC (schematic).

IX gene in a mouse xenograft model by a single intravenous injection of an electroporated BNC (Yamada *et al.*, 2003). We also succeeded in obtaining a significant reduction in the size of human liver-derived tumors in a mouse xenograft model by a single intravenous injection of an electroporated BNC containing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) gene and sequential treatment with gancyclovir (an HSV-tk-dependent inhibitor of DNA polymerases) (Iwasaki *et al.*, 2007). Engineered BNCs, of which the human liver-specific attachment site of the pre-S region is changed to other targeting molecules (epidermal growth factor (EGF), anti-EGF receptor (EGFR) monoclonal antibody), have been shown to accumulate in nonhuman liver tissues *in vitro* and *in vivo* (Tsutsui *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2003). This strongly suggests that BNCs are promising *in vivo* pinpoint DDS carriers targeting not only human liver tissue but also other tissues.

3. SECOND-GENERATION BNCs

Electroporation was used to transiently induce micropores across the lipid bilayer of BNCs. It was found that BNCs stored for long periods tended to show lower incorporation efficiency than freshly prepared BNCs. The intra- and intermolecular disulfide bonds of L proteins (14 Cys residues in three transmembrane segments of the L protein) were postulated to gradually form in a time-dependent manner, which would make BNCs

resistant to electroporation. We substituted each Cys residue with Ala or Ser by genetic modification, and identified at least eight Cys residues of the L protein unnecessary for BNC formation (Nagaoka *et al.*, 2007). The BNC harboring the eight Cys \rightarrow Ala or Cys \rightarrow Ser mutations showed good incorporation efficiency in an electroporation method. This method was not suitable for introducing large materials into a BNC (e.g., >20-kbp plasmid for gene therapy; >10-nm fluorescence-labeled polystyrene beads for bioimaging) and adopting the electroporation method for the good manufacturing practice (GMP)-based production of BNC-based nanomedicines would be very difficult. We recently found that the N-terminal half of the L protein possesses membrane fusogenic activity (Matsuzaki *et al.*, unpublished data). BNCs spontaneously form an \sim 150-nm rigid complex with LPs (BNC-LP conjugate) in which multiple BNCs are embedded on the surface of LPs (Fig. 8.2) (Jung *et al.*, 2008). This property of BNC allows incorporation of various therapeutic materials into BNC-LP conjugates as follows. First, various materials (even 40-kbp plasmid, 100-nm fluorescent polystyrene beads) are constantly incorporated into LPs by conventional methods. Second, LPs are covered with BNCs harboring tissue specificity and high infectivity by the fusogenic activity of BNC. Third, BNC-LP conjugates can deliver various materials incorporated specifically and efficiently into human liver-derived tumors in a mouse xenograft model

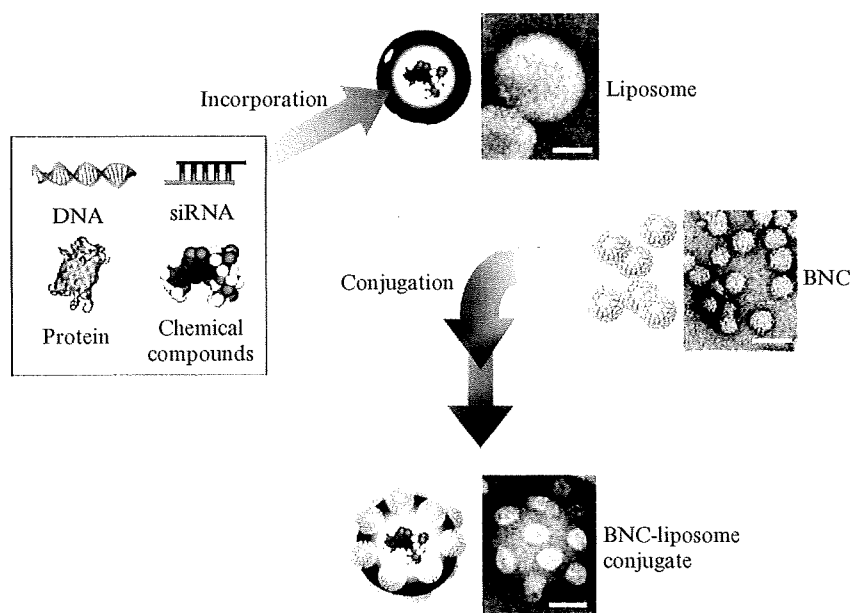


Figure 8.2 Preparation of BNC-LP conjugates (bars: 50 nm).

through intravenous injection (Jung *et al.*, 2008). Additionally, this method can be expanded to GMP-based mass production more readily than electroporation. We therefore designated the BNC-LP conjugate as a “second-generation BNC” (Kasuya and Kuroda, 2009).

With respect to the attachment of BNC-LP conjugates to human liver cells, the N-terminal half of the pre-S region has as a specific receptor for the human liver, which was demonstrated in HBV and BNCs. The intracellular drug release from BNC-LP conjugates may be mediated by the cellular internalization activity (another fusogenic activity) of the C-terminal half of the pre-S region and S region (see Fig. 8.1), as demonstrated in HBV (Glebe and Urban, 2007). In fact, an engineered BNC lacking the N-terminal half of the pre-S region can form a BNC-LP conjugate and deliver incorporated materials to target cells (Kasuya *et al.*, 2008c). BNC-LP conjugates therefore possess the advantages of LPs and viral vectors, namely the use of versatile materials (as with LP) and the HBV-derived infection and active targeting machinery. These results indicate that BNC-LP conjugates are more promising than BNC *per se* as *in vivo* pinpoint DDS carriers.

4. RETARGETING OF BNC-LP CONJUGATES

Due to the narrow tropism of HBV (because of the function of the N-terminal half of the pre-S region), systemically injected BNCs accumulate specifically in human liver-derived tissues *in vivo*. For expanding the indications of BNC-based nanomedicines, it is important to establish the methodology for retargeting BNC from human liver to nonliver tissues by substitution of the pre-S region by other targeting molecules (e.g., cytokines, growth factors, receptors, antibodies, glycans, lectins, aptamers). First, the pre-S (3–77) region is replaced with EGF by genetic engineering. The EGF-displaying BNC lost the specificity to human liver cells and obtained new specificity to EGFR-overexpressing A431 cells *in vitro* (Yamada *et al.*, 2003). This approach needs a time-consuming step for constructing the expression system and sometimes fails to achieve the high productivity of BNCs in yeast cells. Next, a large part (50–159) of the pre-S region is replaced with the *Staphylococcus aureus* protein A-derived IgG Fc-binding ZZ domain. Beyond expectation, the ZZ domain-displaying BNC (ZZ-BNC) is efficiently synthesized in yeast cells. After ZZ-BNC is mixed with anti-EGFR IgG, the mixture is injected intracranially to a glioma-transplanted mouse *orthograft* model. The anti-EGFR IgG-displaying BNC accumulated in the EGFR-overexpressing transplanted glioma in the mouse corpus striatum (Kurata *et al.*, 2008; Tsutsui *et al.*, 2007), indicating that the antibody-displaying ZZ-BNC is applicable for

in vivo use. In 2008, because the ZZ domain contains many Lys residues, ZZ-BNC was modified with *N*-hydroxysuccinimide (NHS)-biotin to display biotin molecules onto the BNC surface. The biotinylated ZZ-BNC can be used for displaying various biotinylated targeting molecules (see above) by using an avidin (e.g., streptavidin, neutravidin) as an adaptor. For instance, the *Phaseolus vulgaris* agglutinin-L₄ isolectin (L₄-PHA)-displaying BNC (PHA-BNC) has been shown to accumulate *in vivo* in highly metastatic malignant tumors which overexpress β 1-6-branching *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), a specific ligand of L₄-PHA (Kasuya *et al.*, 2008c). PHA-BNC-LP conjugate can deliver luciferase-expressing plasmid to the β 1-6GlcNAc-overexpressing cells, showing that the lack of a large part of the pre-S region does not affect the formation of BNC-LP conjugates. We recently revealed that the fusogenic activity of BNC required for LP conjugation is delineated in the short sequence at the N-terminal of pre-S region, which remains in ZZ-BNC (Matsuzaki *et al.*, unpublished data). These data strongly suggested that the engineered BNCs (ZZ-BNC, biotinylated ZZ-BNC) and their LP conjugates can be used for lesion-specific pinpoint DDS carriers.

In this chapter, we describe methods to prepare BNC-LP conjugates containing DNA, and BNC-LP conjugates containing an anticancer drug (doxorubicin (DOX)), and the effects of these BNC-LP conjugates in *in vitro* and *in vivo* systems.

5. OVEREXPRESSION OF BNCs IN *S. CEREVISIAE*

BNC is produced in *S. cerevisiae* AH22R⁻ (*a leu2 his4 can1 cir⁺ pho80*) strain (Kobayashi *et al.*, 1988). The yeast cells are transformed by the spheroplast method (Hinnen *et al.*, 1978) with the YE_p plasmid pGLDLIIP39-RcT (Kuroda *et al.*, 1992), which encodes the N-terminal chicken lysozyme signal sequence-fused HBV envelope L protein (subtype *adi*) under the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GLD; also called TDH3) gene promoter. For production of ZZ-BNC, the DNA segment encoding the pre-S region (50–159) in the plasmid pGLDLIIP39-RcT is replaced with the DNA segment encoding the IgG Fc-binding ZZ domain derived from *S. aureus* protein A (Tsutsui *et al.*, 2007). The LEU2⁺ yeast transformants are cultured in a synthetic selection medium 8S5N-P400 (Yamada *et al.*, 2001) at 30 °C for 7 days, harvested by centrifugation, and stored at –80 °C. The amount of BNC in yeast cells is estimated to be ~40% of total soluble proteins (Kuroda *et al.*, 1992).