

200912044A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

「経口型抗がん剤の metronomic dosing による腫瘍内微小環境変化を利用した
革新的 siRNA デリバリー技術の開発とがん治療への応用」に関する研究

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 石田 竜弘

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告		
「経口型抗がん剤の metronomic dosing による腫瘍内微小環境変化を利用した革新的 siRNA デリ バリー技術の開発とがん治療への応用」に関する研究 -----		1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----		1 0
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----		1 1

「経口型抗がん剤の metronomic dosing による腫瘍内微小環境変化を利用した革新的 siRNA
デリバリー技術の開発とがん治療への応用」に関する研究

研究代表者 石田 竜弘 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究要旨 siRNA を薬剤として利用する場合、生体内動態を量的・空間的に制御することが重要である。表在性の腫瘍を除き、siRNA の静脈内投与は不可避である。100nm 程の粒子径を持つナノキャリアは腫瘍内新生血管内皮の隙間を通過して腫瘍に集積する。しかし、血管周囲に留まるだけで腫瘍深部まで到達できない。これを改善するには、キャリアの改変だけでは不可能であり、腫瘍内の 3 次元的空間を人為的に変化させる必要があることに気づいた。

申請者は 21 年度の研究において、外来化学療法で汎用されている経口フッ化ピリミジン系抗がん剤(S-1)の繰り返し投与と併用することで siRNA・キャリア複合体の腫瘍内移行性および拡散性が亢進され、このような腫瘍内移行性変化に付随して顕著な抗腫瘍効果が得られることを確認した。TNF- α や TGF- β 阻害剤の併用によりナノキャリアの腫瘍への移行性が向上することが報告されているが、これらの薬剤は本邦では認可されておらず、現時点では臨床への応用は期待できない。一方、本検討で使用した S-1 は既に本邦において臨床応用されており、このような薬剤と組み合わせるだけで siRNA の効果が向上しうる本戦略は、siRNA を用いたがん治療の試みを実現化する優れた戦略である。

A. 研究目的

siRNA を薬剤として利用する場合、その生体内動態を量的・空間的に制御することが重要である。表在性の腫瘍を除き、siRNA の静脈内投与は不可避である。100nm 程の粒子径を持つナノキャリアは腫瘍内新生血管内皮の隙間を通過して腫瘍に集積する。しかし、血管周囲に留まるだけで腫瘍深部まで到達できない。これを改善するには、キャリアの改変だけでは不可能であり、腫瘍内の 3 次元的空間を人為的に変化させる必要がある。申請者は既に、外来化学療法で汎用されている経口フッ化ピリミジン系抗がん剤(S-1)の繰り返し投与と併用することで siRNA・キャリア複合体の腫瘍内移行性および拡散性の亢進とそれに基づく顕著な抗腫瘍効果が得られることを確認している。本研究では経口型抗がん剤(S-1)の繰り返し投与時の腫瘍内微小環境変化について検討を行い、siRNA・キャリア複合体の腫瘍移行性・拡散性の評価に基づく併用投与時の最適な regimen の確立を目的として研究を行う。

当該研究期間において、

1. S-1 の低用量頻回投与による siRNA・リポソーム複合体の腫瘍蓄積量の変化
2. S-1 の低用量頻回投与による siRNA・リポソーム複合体の腫瘍内分布の変化
3. S-1 と siRNA・リポソーム複合体の併用による抗腫瘍効果と安全性

について主として検討した。

B. 研究方法

C. siRNA 搭載リポソームの腫瘍移行性・腫瘍内拡散性

最終的に臨床応用を目指すことから、ヒト大腸癌細胞をヌードモデルに移植し、これをモデルとした。siRNA 搭載リポソームの腫瘍内移行性に関しては、放射ラベル(RI ラベル)したリポソームを用い、腫瘍内の放射活性を指標として評価した。腫瘍内拡散性に関しては、リポソームを蛍光ラベルし、投与後に腫瘍切片を作成し、これを蛍光顕微鏡で観察することで評価した。

I. 担がんマウスの作成

BALB/c *nu/nu* 雄性マウスの背部皮下に DLD-1 細胞懸濁液 (2×10^6 cells/100 μ L) を接種した。5 日後、腫瘍体積が約 100 mm³ に達したマウスを *in vivo* の実験に用いた。

II. siRNA 搭載リポソームの調製

Cationic liposome (CL) は Bangham 法により調製した。脂質組成が DOPE:POPC:CHOL:DC-6-14=3:2:3:2 (モル比) となるように脂質を試験管内で混合した。次に、減圧下溶媒 (クロロホルム) を除去し、試験管内に脂質薄膜を形成させた。この脂質薄膜に内

水相として 9% スクロース溶液 (pH 7.4) を加え、脂質薄膜を完全に水和させ、MLV (multilamellar vesicle) を得た。この MLV をエクストリュージョン法により整粒し、粒子径が約 110 nm となる LUV (large unilamellar vesicle) を調製した。CL への PEG 修飾は、ポストインサージョン法により行った。ポストインサージョン法は、基本となるリポソームを調製後、9% スクロース溶液中に完全に溶解させた mPEG₂₀₀₀-DSPE を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量に対してモル比で 5% となるように CL 溶液に添加し、振盪機付きインキュベータ中で 37°C、1 時間、軽く振盪させながら行った。調製した PEG 修飾 CL の粒子径及びゼータ電位は、 112.3 ± 8.9 nm 及び 20.11 ± 1.13 mV であった (n=3)。

次いで、Core-siRNA を調製するために、siRNA 溶液と 0.2 mg/mL HA 溶液との混合溶液 (siRNA/HA= 1/1 (weight ratio)) と、0.2 mg/mL PRO 溶液を等量ずつ混合し、室温で 5 分間インキュベーションした。このとき、混合する (siRNA+HA) と PRO の重量比は、最適化検討の結果から、1.8 と固定した。次に Core-lipoplex を調製するために、PEG 修飾 CL 溶液と Core-siRNA 溶液を混合し、15 秒間攪拌した後、10 分間室温で放置した。このとき、混合する Lipid と siRNA のモル比は、最適化検討の結果から 2000 に固定し Core-lipoplex を調製した。

III. RI・蛍光標識リポソームの調製

³H-CHE 修飾リポソーム: 脂質相マーカーとして ³H-Cholesteryl hexadecylether を脂質量 0.5 μmol あたり 720,000 dpm のカウントを持つように、脂質薄膜を形成させるときに添加した。

DiD 修飾リポソーム: 脂質薄膜を形成させる際、DiD を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量に対しモル比で 1% となるように添加した。

IV. In vivo imaging system による siRNA 搭載リポソームの腫瘍移行性評価: 定性的評価

腫瘍体積が約 100 mm³ 以上に達した DLD-1 担がんマウスに対して、S-1 溶液を経口用ゾンデにより tegafur 量で 6.9 mg/kg となるように経口投与した。S-1 は投与開始から 7 日間、毎日投与を行った。最終 S-1 投与日に、DiD ラベル化 PEG 修飾 core-lipoplex を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量で 25 mg/kg となるように 200 μL ずつ尾静脈より投与した。その投与 6、12、24、48、96、144 時間後に Fluorescence Image Analyzer

LAS-4000 IR multi color を用いて、イソフルランで麻酔をかけたマウスの全身像を撮影することにより腫瘍内への蓄積を評価した。コントロールとして、S-1 の metronomic 投与を施さなかったマウスを用いた。また、DiD ラベル化 PEG 修飾 core-lipoplex 投与 24 時間後にマウスを屠殺し、摘出した腫瘍、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓についても撮影を行った。

V. RI 用いた siRNA 搭載リポソームの腫瘍移行性評価: 定量的評価

腫瘍体積が約 100 mm³ 以上に達した DLD-1 担がんマウスに対して、IV に示すように S-1 を投与し、最終 S-1 投与日に ³H-CHE ラベル化 PEG 修飾 core-lipoplex を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量で 25 mg/kg となるように 200 μL ずつ尾静脈より投与した。その 24 時間後に血液を心臓より 100 μL 採取し、また肺、肝臓、脾臓、腎臓、腫瘍も採取し、血液および各臓器中の放射活性を測定することで siRNA 搭載リポソームの腫瘍内移行性を評価した。

(1) 安全性および抗腫瘍効果の検討

I. PEG 修飾 lipoplex (Ago2 標的 siRNA 含有) の全身投与時の安全性評価

ddY マウスに対し、以下の 6 群 (Sucrose 0 μg/mouse、PEG 修飾 CL 0 μg/mouse、Free siAgo2 80 μg/mouse、PEG 修飾 lipoplex (siCont 含有) 80 μg/mouse、PEG 修飾 lipoplex (siAgo2 含有) 40 μg/mouse、PEG 修飾 lipoplex (siAgo2 含有) 80 μg/mouse を 1 日間隔で合計 8 回マウス尾静脈より投与した。

体重変化: 頻回投与期間中、マウスの行動や状態の観察及び生死の確認を行うとともに、マウス体重を測定した。

組織重量: 最終投与から 24 時間後にマウスを解剖し、種々の臓器 (脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体) の重量を測定した。

血液学的検査及び血液生化学的検査: 最終投与から 24 時間後に採血を行い、血液学的検査 (RBC (赤血球)、WBC (白血球)、Hb (ヘモグロビン)、Ht (ヘマトクリット)、PLT (血小板))、ならびに血液生化学的検査 (AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)、ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ)、AIP (自己免疫性膵炎)、LDH (乳酸脱水素酵素)、BUN (尿素窒素)) を行った。

病理組織学的検査: 摘出した種々の臓器 (脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、

精巢上体、胃、空腸、回腸 (パイエル板含む)、骨髓、胸骨、病変部) を 10% 緩衝ホルマリン固定液に浸漬し、常法に従い包埋、薄切の後、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施し、H.E.染色標本を作成した。骨髓、胸骨は切り出しの前に脱灰操作を加えた。その後作成した H.E.染色標本を光学顕微鏡にて観察した。

免疫組織化学的検査: PEG 修飾 siAgo2-lipoplex (80 µg) 及び PEG 修飾 siCont-lipoplex (80 µg) 投与群の肝臓、脾臓組織切片を抗 cleaved caspase-3 抗体で染色し、陽性細胞をカウントした。

II. 抗腫瘍効果

腫瘍体積が約 100 mm³ 以上に達した DLD-1 担がんマウスに対し、1) PEG 修飾 core-lipoplex (siBcl2 もしくはコントロールとして siGFP 含有) を siRNA 量で 10 µg/200µL ずつ 1 日間隔で合計 8 回マウス尾静脈より投与し、同時に 2) S-1 を tegafur 量で 6.9 mg/kg ずつ毎日経口より投与を行い、腫瘍体積変化と体重変化について検討を行った。さらに、PEG 修飾 core-lipoplex の最終投与 2 日後に、DLD-1 担がんマウスから腫瘍を摘出し、重量を測定した。

III. PEG 修飾 core-lipoplex (Bcl-2 標的 siRNA 含有) と S-1 の併用療法による腫瘍内 Bcl-2 タンパク質発現とアポトーシス誘導

ウェスタンブロッティング: DLD-1 担がんマウスから摘出した腫瘍を冷 PBS (-) で洗浄した後、液体窒素に入れて凍結させた。その後粉碎し、重量の 5-10 倍 (20 mg の腫瘍ならば、100-200 µL) の冷 Lysis buffer を加え腫瘍を完全に溶解させた。サンプルを 20 µL (40 µg protein/レーン) となるように SDS-PAGE した。ニトロセルロースに転写後、一次抗体として mouse monoclonal anti-human Bcl-2 antibody、mouse monoclonal anti-human Bax antibody を用いて Bcl-2、Bax を検出した。また、目的タンパク質のバンドを ECL Plus Chemiluminescence Reagent を用いて LAS-4000 EPUVmini (FUJIFILM) により検出した。

アポトーシスの検出: DLD-1 担がんマウスから摘出した腫瘍を 4% PFA 溶液で固定後、30% スクロース溶液中で置換した。その後、腫瘍を Tissue-Tek O.C.T. Compound に包埋・凍結させ、Cryostat (Leica Microsystems, Solms, Germany) を用いて厚さ 5 µm の腫瘍切片を得た。この腫瘍切片に対して TUNEL 染色を行った。その後、Hoechst33342 溶液 (5 µg/mL) を添加して室温で 10 分間インキュベートすることで核染色を行った。その後、蛍光顕微鏡

(Axiovert 200M) を用いてアポトーシス細胞を観察した。また、Analyze Software (AxioVision、Zeiss) を用いてアポトーシス細胞の割合を定量評価した。

・倫理面への配慮

当該研究に関して、全ての動物実験プロトコルは所属機関における動物実験委員会による審査・承認を受けている。また、動物愛護の精神に乗っ取り、実験により派生する恐怖・苦痛をできるかぎり軽減できる方法を選択し、用いた。

研究結果

(1) siRNA 搭載リポソームの腫瘍移行性・腫瘍内拡散性

これまでの検討より、S-1 を metronomic 投与することによって腫瘍内の微小環境が変化し、全身投与した PEG 修飾 liposome の腫瘍蓄積量が有意に向上する (liposome に対する EPR 効果が増強される) ことが明らかとなっている。そこで本項では、S-1 の metronomic 投与による EPR 効果の増強が、siRNA 含有 PEG 修飾 core-lipoplex に対しても見られる現象であるのか検討した。本検討では、S-1 を metronomic に投与した群 (S-1 処置群) と無処置群での腫瘍内への PEG 修飾 core-lipoplex の蓄積性の差異を、まず in vivo imaging system を用いて経時的に観察した。その結果、これまでの報告と同様に、S-1 処置群において腫瘍部位に PEG 修飾 core-lipoplex のマーカーである DiD 由来の蛍光が強く確認され、その強度を定量し S-1 処置群と無処置群を比較した結果においても、S-1 処置群の方が無処置群と比べて高い PEG 修飾 core-lipoplex 腫瘍蓄積性を示すことが明らかとなった。また、PEG 修飾 core-lipoplex 投与 144 時間後において、無処置群ではほとんど腫瘍部位に蛍光が観察されないが、S-1 処置群では蛍光が未だ強く観察された。このことから、S-1 の metronomic 投与は、腫瘍内に貯留された PEG 修飾 core-lipoplex の retention を高める作用を有している可能性が示唆された。一方、DiD ラベル化 PEG 修飾 core-lipoplex 投与から 24 時間後に腫瘍及び種々の臓器を採取して観察を行った場合においても、腫瘍において S-1 処置群では蛍光が顕著に強く確認された。また、腫瘍以外の臓器においては、このような違いは観察されなかった。以上より、S-1 の metronomic 投与により PEG 修飾 core-lipoplex の腫瘍蓄積性が亢進されることが確認できた。

次いで、より詳細に S-1 の metronomic 投与による EPR 効果の増強を検証するために、³H-CHE ラベル化 PEG 修飾 core-lipoplex を用いた放射活性の測定による腫瘍蓄積量の定量的評価を行った。その結果、S-1 処置群の方が無処置群と比べて PEG 修飾 core-lipoplex の腫瘍蓄積量が有意に高い (約 1.56 倍) ことが確認された。また、S-1 処置群と無処置群との間で PEG 修飾 core-lipoplex の血中濃度、肺・肝臓・脾臓・腎臓への蓄積量に有意な差は見られなかった。この結果より、S-1 の metronomic 投与による蓄積量の増加は、腫瘍組織のみで見られる現象であり、その他主な臓器では見られないことが明らかとなった。このことは、血管新生阻害作用を有する S-1 が、腫瘍内の血管のみにダメージを与え、その他正常組織内の血管にはダメージを与えていないことを示唆している。

(2) siRNA 搭載リポソーム投与時の安全性

siRNA は核酸であり、大量投与や繰り返し投与によって重篤な副反応が生じる可能性が高い。そこで、がん細胞のみならず正常細胞にも普遍的に存在している Ago2 遺伝子を標的とした siRNA を搭載した PEG 修飾 lipoplex の全身投与時の安全性について検討した。本検討では、健常なマウスに対して siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の高用量 (siRNA: 80 µg) の投与、抗腫瘍効果評価時と同じ投与量 (40 µg) の投与、siAgo2 単独での高用量 (80 µg) の投与、siCont 含有 PEG 修飾 lipoplex の高用量 (80 µg) の投与、PEG 修飾 CL 投与、及びスクロス投与を 1 日おきに計 8 回行い、その期間中のマウスの様子及び体重変化を検討した。その結果、まず頻回投与期間中、どの群においてもマウスの行動や状態には異常は見られず、死亡したマウスも存在しなかった。また、体重変化についてはどの群も増加傾向にあったが、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の 80 µg 投与群においては、他の群と比較すると増加抑制傾向にあることが示された。この結果より、当初想定していたように siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の全身投与 (特に 80 µg 投与群) によって、正常組織に何らかの影響が生じている可能性が示唆された。

そこで次に、最終投与 24 時間後にマウスを屠殺して種々の臓器を採取し、その重量を測定することで比較検討を行った。その結果、ほとんどの臓器重量において、群間で有意な差は見られなかった。しかし、脾臓重量に関して、siAgo2 含有

PEG 修飾 lipoplex 投与群の脾臓重量は、スクロス投与群と比較して有意に増大 (脾臓肥大) していることが明らかとなった。

次いで、マウス屠殺時に血液を採取し、血液学的検査 (RBC、WBC、Hb、Ht、PLT)、ならびに血液生化学的検査 (AST、ALT、AIP、LDH、BUN) を行った。まず血液学的検査の結果、どの群間においても検査値に有意な差は見られなかった。しかし、siAgo2含有PEG修飾lipoplex投与によって、軽度ながら赤血球数の減少ならびに中等度の網状赤血球数の増加が認められた。従って、siAgo2含有PEG修飾lipoplex投与が造血組織に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。また、血液生化学的検査の結果、siAgo2含有PEG修飾lipoplex投与によって、軽度ながらLDH値が高くなる傾向が観察されたが、どの群間においても有意な差は見られなかった。LDHは乳酸脱水素酵素であり、ほとんどあらゆる細胞に含まれているが、肝臓や腎臓、心筋、骨格筋、赤血球などに特に多く含まれている。従って、siAgo2含有PEG修飾lipoplexの全身投与によって、これら臓器中の一部細胞が壊死している可能性が示唆された。

次いで、摘出した種々の臓器 (脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、胃、空腸、回腸 (パイエル板含む)、骨髄、胸骨、病変部) に対して、病理組織学的検査を行った。その結果、siAgo2含有PEG修飾lipoplexの80 µg投与群において、一例ではあるが、脾臓における中程度の髓外造血像 (赤芽球及び未成熟赤芽球の増加を含む) が認められた。また、肺・肝臓・腎臓において変化が見られたものの、発生状況から用量に対応した変化ではなく、毒性学的意味はない変化と判断した。

最後に、siAgo2もしくはsiCont含有PEG修飾lipoplexの80 µg投与群の脾臓ならびに肝臓の組織切片を用いて、siAgo2含有PEG修飾lipoplexの全身投与によるアポトーシス細胞数の増加の有無について免疫組織化学的検査を行った。その結果、脾臓、肝臓ともにcleaved caspase-3陽性細胞の有意な増加は認められなかった。ただし、先程siAgo2含有PEG修飾lipoplexの80 µg投与群で髓外造血像が認められた1個体については、cleaved caspase-3陽性細胞の顕著な増加が認められるという興味深い結果が得られた。

以上をまとめると、siAgo2含有PEG修飾lipoplexの繰り返し全身投与によって脾臓等に何らかの変化を生じたものの、その他重篤な変化は生じず、

siAgo2含有PEG修飾lipoplexの安全性が確認された。

(3) 抗腫瘍効果の検討

siBcl2含有PEG修飾core-lipoplex (全身投与) と S-1 (metronomic投与) とを組み合わせることによって、I) 腫瘍細胞 (特に腫瘍血管周辺の細胞) 内のBcl-2タンパク質発現量の低下によって、S-1/5-FUに対する感受性が亢進し、S-1/5-FUによる殺細胞効果が増強し、さらにII) S-1のmetronomic投与によりPEG修飾core-lipoplexがより腫瘍組織へ、且つより腫瘍深部まで移行し、siBcl2による殺細胞効果が腫瘍内のより広範囲で見られ、結果として*in vivo*で非常に高い抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え、検討を行った。

治療スケジュールとしては、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplexを1日おきに計8回、siRNA量で10 µg/200 µLずつ尾静脈より投与し、一方S-1はtegafur量で6.9 mg/kgとなるように毎日経口投与した。その結果、スクロース群と比較してsiBcl2含有PEG修飾core-lipoplexとS-1はそれぞれ単剤で21.5%、31.4% (DLD-1接種後20日目) の腫瘍成長抑制効果を示したが、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplexとS-1とを併用することによって62.8%と顕著に高い腫瘍成長抑制効果が得られた。この併用効果は、それぞれの薬剤単独時の効果を単純に足した効果 (52.9%) に比べて約10%も効果が増強しており、相乗的な効果であると言える。この相乗的な効果は、先程I)、II)で示した効果に起因したものと考えられる。また、最終投与から48時間後 (DLD-1接種後21日目) にマウスを屠殺し、摘出した腫瘍重量を測定して比較検討した結果、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplexとS-1の併用群では、それぞれ単独群 (siBcl2; 20.4%、S-1; 28.8%) と比較して顕著に高い腫瘍重量抑制効果 (63.0%) が確認された。一方、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplexとS-1併用群において、他の群と比較して顕著な体重減少は見られず、これらの併用療法は安全性が高いことが示唆された。

次に、上記治療後のマウスから摘出したDLD-1腫瘍を用いて、腫瘍内のBcl-2及びBaxタンパク質発現量をウェスタンブロッティングによって確認した。その結果、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplex、S-1のそれぞれ単独投与によって、多少のBcl-2タンパク質発現低下が見られたが、両者併用することによって顕著なBcl-2タンパク質発現低下が確認された。これに対して、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplexや

S-1投与によってBaxタンパク質発現には変化が見られなかった。さらに、上記のDLD-1腫瘍を用いて腫瘍内アポトーシス細胞の比率を評価するために、腫瘍切片をTUNEL染色し蛍光顕微鏡にて観察を行った。また、Hoechst33342を用いて核染色を行った。得られた像から解析ソフトを用いて定量評価したところ、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplex単独投与群では10.5%、S-1単独投与群では15.9%のアポトーシス誘導が見られたが、これら併用投与群では29.6%と顕著に高いアポトーシス誘導が確認された。以上の結果をまとめると、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplexとS-1の併用療法によって、siBcl2含有PEG修飾core-lipoplexの腫瘍蓄積性が向上し、siBcl2によるアポトーシス誘導効果が増強され、同時に腫瘍内Bcl-2タンパク質の顕著な発現抑制によりS-1/5-FUに対する感受性が向上し、S-1/5-FUによるアポトーシス誘導効果が増強された結果、顕著に高い抗腫瘍効果に繋がったのではないかと考えられた。

D. 考察

これまでのsiRNAのDDS研究は、siRNAを運ぶナノキャリア (送り手) に焦点を当てた研究が主流であった。しかし、ナノキャリアは血行性に腫瘍組織へ到達するため、腫瘍内への移行はおのずと腫瘍内血管ネットワークに依存する。ところが、腫瘍内の無秩序な血管パターンや高い間質圧が原因となり、腫瘍深部の細胞までsiRNAを送達させることは現状のDDSでは困難である。このことを改善するためにはキャリアの改変だけでは不可能であり、腫瘍内 (受け手) の三次元的空間を人為的に変化させる必要があると思われる。従って、siRNAの効率的なDDSの開発を進める上で、キャリアの改変のみならず、腫瘍内の微小環境を改変させてsiRNAの腫瘍移行性・腫瘍内拡散性をもたせることは、革新的なsiRNAデリバリー技術の開発につながるものと考えられる。

我々が見出したS-1のmetronomic投与によるEPR効果の増強メカニズムに関しては次のように考察している。S-1のmetronomic投与によって、A) 腫瘍新生血管の内皮細胞が傷害され、内皮細胞間の間隙が広がり、より漏出性の高い血管が形成されたこと、B) 腫瘍内血管系が正常化し、腫瘍内の広範囲に血液が分布するようになったこと、さらにC) 血管近傍のがん細胞が傷害され、

血管外スペースが増加したことなど腫瘍内の微小環境が改変されたことが想定される。その結果、全身投与した PEG 修飾 liposome の腫瘍蓄積量が増加しているのではないかと考察している。また、この現象は、粒子径が約 400 nm の PEG 修飾 lipoplex を用いた場合でも見られており、ナノキャリアの粒子径に依存しない現象である可能性が示唆されている。

この現象を利用して、Bcl-2 標的 siRNA (siBcl2) と抗がん剤 S-1 を組み合わせた新規がん治療戦略を考えた。その戦略とは、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex と S-1 を併用することによって、1) 抗がん剤に対する感受性及び抵抗性に大きく関与する Bcl-2 をノックダウンすることで S-1/5-FU による殺細胞効果が高まり、2) S-1 の metronomic 投与により PEG 修飾 core-lipoplex をより多く腫瘍組織へ、且つより腫瘍深部まで移行させ、その結果 siBcl2 による殺細胞効果が腫瘍内のより広範囲で期待できる、というものであった。実際 1) 2) が実現できれば、結果として相乗的な効果が見られ、高い抗腫瘍効果につながる。また、この併用療法は、異なる 2 つの薬剤が、互いに効果を向上し合うと考えられ、『Double modulation therapy』と定義されるべきものである。検討の結果、顕著に高い、且つ相乗的な抗腫瘍効果が得られ、この併用療法の有用性を確認することができた。現在に至るまで、siRNA を effector (抗がん作用を示す薬剤)、もしくは modulator (effector の効果を変化させる作用を示す薬剤) のみとして用いる研究が主流であった。しかし、組み合わせによっては siRNA に effector と modulator の両作用を発揮させることが可能であり、また、抗がん剤に関してもほとんどが effector として用いるのが普通であるが、組み合わせによっては modulator として機能させることが可能であることも明らかとなった。本検討で得られた知見は、今後、siRNA に代表される核酸医薬と化学療法とを組み合わせた新しいがん治療法の開発に向けた一歩になるものと期待している。

E. 結論

ナノキャリアを利用した抗がん剤の腫瘍へのデリバリー術はすでに確立されており、Doxil などの製剤が臨床で用いられている。抗がん剤の場合、漏れ出た薬剤自体が腫瘍内を拡散して効果を発揮するのに対し、siRNA はキャリアからの放出性に乏しく、また siRNA 単体では細胞膜不透過性

であるため、キャリアを介して細胞内に導入されなければ、その効果を発揮することはできない。したがって、siRNA が薬効を発現できる領域はナノキャリアの分布領域に依存する。そのため、siRNA の薬効が及ぶ領域を拡大させるためには、腫瘍内においてナノキャリア自体の拡散性を向上させ、その分布領域を拡大させることが非常に重要となる。S-1 は大腸がん・胃がん・膵がん治療などで既に臨床応用されており、この S-1 との併用によって、より腫瘍深部の細胞に siRNA が導入され、薬効発現につながったことは、siRNA を用いたがん治療の実現に大きく貢献する新たな知見である。

今後、この S-1 の metronomic dosing による腫瘍内微小環境変化のメカニズムの解明を行うことで、S-1 投与による腫瘍内の微小環境変化を理解し、この現象を最大限に生かした siRNA によるがん治療戦略の確立を試みる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ishihara, T., Takeda, M., Sakamoto, H., Kimoto, A., Kobayashi, C., Takasaki, N., Yuki, K., Tanaka, K., Takenaga, M., Igarashi, R., Maeda, T., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Otsuka, M., Ishida, T., Kiwada, H., Mizushima, Y. and Mizushima, T., Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharm. Res.*, 26, 2270-2279 (2009)
- (2) Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H., Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production. *J. Control. Release*, 137, 234-240 (2009)
- (3) Abu Lila, A., Kizuki, S., Doi, Y., Suzuki, T., Ishida, T., Kiwada, H., Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model. *J. Control. Release*, 137, 8-14 (2009)
- (4) Ishida, T., Shiraga, E., Kiwada, H., Synergistic

- antitumor activity of metronomic dosing of cyclophosphamide in combination with doxorubicin-containing PEGylated liposomes in a murine solid tumor model. *J. Control. Release*, 134, 194-200 (2009)
- (5) Abu-Lila, A, Suzuki, T., Doi, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. *J. Control. Release*, 134, 18-25 (2009)
2. 学会発表
- (1) Ishida, T., Kiwada, H., Improvement of tumor-targeting therapy with nanocarriers by changing the tumor microenvironment. 2009 International Symposium of the Intelligent Drug Delivery System., Korea, April (2009)
- (2) Koide, H., Asai, T., Yokoyama, M., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N., Elucidation of ABC phenomenon caused by repeat injection of PEGylated nanocarrier. 4th International Liposome Society Conference. Liposome advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, London, UK, Dec. (2009)
- (3) Ishida, T., Nakamura, K., Matsunaga, M., Doi, Y., Kiwada, H., A novel double modulation strategy in cancer treatment with chemotherapeutic agent and siRNA: siRNA-induced Bcl-2 knockdown increases chemosensitivity against 5-FU and S-1 improves siRNA accumulation in human colorectal tumor xenograft model. 4th International Liposome Society Conference. Liposome advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, London, UK, Dec. (2009)
- (4) Doi, Y., Okada, T., Matsumoto, H., Ishida, T., Kiwada H., Alteration of tumor microenvironment by metronomic S-1 dosing results in augmentation of EPR effect against PEG-coated liposomes. 4th International Liposome Society Conference. Liposome advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, London, UK, Dec. (2009)
- (5) Doi, Y., Hira, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Synergistic antitumor activity of metronomic S-1 dosing in combination with oxaliplatin (1-OHP) – containing PEGylated liposome in a murine solid tumor model. AACR 100th Annual Meeting 2009, USA, April (2009)
- (6) Ishida, T., Amr A., Suzuki, T., Doi, Y., Kiwada, H., Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposome induces significant tumor growth suppression via dual-targeting approach in murine solid tumor model. AACR 100th Annual Meeting 2009, USA, April (2009)
- (7) 岩木雄大、田上辰秋、中村和也、石田竜弘、際田弘志、RNAi 効果発現に対する Lipoplex への PEG 修飾の影響に関する検討、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (8) 土井祐輔、松本春菜、岡田知子、石田竜弘、際田弘志、ナノキャリアに対する EPR 効果に寄与する腫瘍内微小環境変化に関する研究：S-1 の低用量頻回投与(metronomic chemotherapy)から得られた知見、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (9) 松本春菜、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、がん細胞種が及ぼす抗がん剤封入りポソームの腫瘍移行性とその治療効果への影響、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (10) 中村和也、松永真理子、岩木雄大、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、テガフル製剤 S-1 と Bcl-2 標的 siRNA 封入りポソームの併用による double modulation therapy の有用性、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (11) 上原友美、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、ABC 現象回避を目的とした lipoplex に対する polymer 修飾剤 polyglycerol の有効性評価、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (12) 上原友美、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、

- ABC 現象回避を目的としたポリグリセロール修飾リポプレックスの有効性評価、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島)、2009 年 11 月
- (13) 岡田知子、土井祐輔、Abu-Lila Amr、石田竜弘、際田弘志、フッ化ピリミジン系経口抗癌剤と Oxaliplatin 封入 PEG 修飾カチオンリポソーム併用による抗腫瘍効果の検討、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島)、2009 年 11 月
- (14) 松本春菜、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、がん細胞種の違いが及ぼす PEG 修飾リポソームの腫瘍移行及び分布への影響、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島)、2009 年 11 月
- (15) 岩木雄大、城慎二、中村和也、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、Lipoplex の PEG 修飾による細胞内取り込み量の変化及び RNAi 効果に与える影響に関する検討、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島)、2009 年 11 月
- (16) 土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、S-1 の metronomic chemotherapy がもたらすナノキャリア腫瘍集積性向上に関わる腫瘍内微小環境変化、第 68 回日本癌学会学術総会(横浜)、2009 年 10 月
- (17) 中村和也、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、siRNA による Bcl-2 遺伝子ノックダウンと S-1 のメトロニック療法の組み合わせによる相乗的な制がん効果、第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2009 年 10 月
- (18) 土井祐輔、岡田知子、松本春菜、石田竜弘、際田弘志、ナノキャリアに対する EPR 効果に寄与する腫瘍内微小環境変化に関する検討：S-1 の低用量頻回投与(metronomic chemotherapy)から得られた知見、第 18 回 DDS カンファレンス (静岡)、2009 年 9 月
- (19) 田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、PEG を用いた核酸送達システムにおいて核酸が anti-PEG IgM 分泌に与える影響、第 18 回 DDS カンファレンス (静岡)、2009 年 9 月
- (20) 田上辰秋、中村和也、石田竜弘、際田弘志、siRNA 封入 PEG 修飾リポソーム投与時における siRNA 配列の anti-PEG IgM 分泌に与える影響、遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム (大阪)、2009 年 7 月
- (21) 中村和也、松永真理子、鈴木卓也、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、Argonaute2 標的 siRNA の全身投与による制がん効果及び毒性の検討、遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム (大阪)、2009 年 7 月
- (22) 石田竜弘、際田弘志、核酸デリバリーにおける accelerated blood clearance (ABC)現象、第 25 回日本 DDS 学会 (東京)、2009 年 7 月
- (23) 松永真理子、中村和也、石田竜弘、際田弘志、腫瘍移行性向上を目指した siRNA-lipoplex の改良とその評価、第 25 回日本 DDS 学会 (東京)、2009 年 7 月
- (24) 中村和也、松永真理子、鈴木卓也、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、Argonaute2 遺伝子を標的とした siRNA によるがん治療法の有用性と安全性、第 25 回日本 DDS 学会 (東京)、2009 年 7 月
- (25) 田上辰秋、中村和也、清水太郎、山崎尚志、石田竜弘、際田弘志、ポリエチレングリコール(PEG)を利用した核酸送達システムにおいてプラスミド DNA 配列内の CpG 除去が抗 PEG 抗体産生に与える影響、第 25 回日本 DDS 学会 (東京)、2009 年 7 月
- (26) Abu-Lila Amr、城慎二、土井祐輔、鈴木卓也、石田竜弘、際田弘志、Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via dual-targeting approach in a murine solid tumor model、第 25 回日本 DDS 学会 (東京)、2009

年 7 月

- (27) 石田竜弘、浅井知浩、奥直人、際田弘志、Argonaute2 標的 siRNA リポプレックスを用いたがん治療戦略、学術シンポジウム 4 RNAi 医薬の展望 -From Bench to Bedside -, 日本薬剤学会第 24 年会 (静岡)、2009 年 5 月
- (28) 石田竜弘、抗がん剤 targeted delivery によるがん治療 ～その現状と今後の課題について～、がん治療フォーカスグループシンポジウム、日本薬剤学会第 24 年会 (静岡)、2009 年 5 月
- (29) Abu-Lila Amr、鈴木卓也、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEG-coated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. 日本薬剤学会第 24 年会

(静岡)、2009 年 5 月

- (30) 松永真理子、中村和也、鈴木卓也、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、フッ化ピリミジン系経口抗がん剤併用による siRNA-lipoplex の腫瘍移行向上の試み、日本薬剤学会第 24 年会 (静岡)、2009 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
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
Ishihara, T., Takeda, M., Sakamoto, H., Kimoto, A., Kobayashi, C., Takasaki, N., Yuki, K., Tanaka, K., Takenaga, M., Igarashi, R., Maeda, T., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Otsuka, M., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H., Mizushima, Y. and Mizushima, T.,	Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles.	<i>Pharm. Res.</i>	26	2270-2279	2009
Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production.	<i>J. Control. Release</i>	137	234-240	2009
Abu Lila, A., Kizuki, S., Doi, Y., Suzuki, T., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model.	<i>J. Control. Release</i>	137	8-14	2009
<u>Ishida, T.</u> , Shiraga, E., Kiwada, H.,	Synergistic antitumor activity of metronomic dosing of cyclophosphamide in combination with doxorubicin-containing PEGylated liposomes in a murine solid tumor model.	<i>J. Control. Release</i>	134	194-200	2009
Abu-Lila, A, Suzuki, T., Doi, Y., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model.	<i>J. Control. Release</i>	134	18-25	2009

Research Paper

Accelerated Blood Clearance Phenomenon Upon Repeated Injection of PEG-modified PLA-nanoparticles

Tsutomu Ishihara,^{1,2} Miho Takeda,¹ Haruka Sakamoto,¹ Ayumi Kimoto,¹ Chisa Kobayashi,¹ Naoko Takasaki,¹ Kanae Yuki,¹ Ken-ichiro Tanaka,¹ Mitsuko Takenaga,³ Rie Igarashi,³ Taishi Maeda,¹ Naoki Yamakawa,¹ Yoshinari Okamoto,¹ Masami Otsuka,¹ Tatsuhiro Ishida,⁴ Hiroshi Kiwada,⁴ Yutaka Mizushima,² and Tohru Mizushima^{1,5}

Received May 24, 2009; accepted July 13, 2009; published online July 25, 2009

Purpose. We recently developed prostaglandin E₁ (PGE₁)-encapsulated nanoparticles, prepared with a poly(lactide) homopolymer (PLA, Mw=17,500) and monomethoxy poly(ethyleneglycol)-PLA block copolymer (PEG-PLA) (NP-L20). In this study, we tested whether the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon is observed with NP-L20 and other PEG-modified PLA-nanoparticles in rats.

Methods. The plasma levels of PGE₁ and anti-PEG IgM antibody were determined by EIA and ELISA, respectively.

Results. Second injections of NP-L20 were cleared much more rapidly from the circulation than first injections, showing that the ABC phenomenon was induced. This ABC phenomenon, and the accompanying induction of anti-PEG IgM antibody production, was optimal at a time interval of 7 days between the first and second injections. Compared to NP-L20, NP-L33s that were prepared with PLA (Mw=28,100) and have a smaller particle size induced production of anti-PEG IgM antibody to a lesser extent. NP-L20 but not NP-L33s gave rise to the ABC phenomenon with a time interval of 14 days. NP-L33s showed a better sustained-release profile of PGE₁ than NP-L20.

Conclusions. This study revealed that the ABC phenomenon is induced by PEG-modified PLA-nanoparticles. We consider that NP-L33s may be useful clinically for the sustained-release and targeted delivery of PGE₁.

KEY WORDS: ABC phenomenon; anti-PEG IgM antibody; biodegradable nanoparticles; encapsulation; prostaglandin E₁.

INTRODUCTION

Nanoparticles such as liposomes, lipid emulsions and polymeric solid particles that are approximately 100–200 nm in diameter have been widely used as carrier systems for

targeted drug delivery to tumors, inflammatory tissues and vascular lesions due to their enhanced permeability and retention (EPR) effects (1). However, this size of particles is easily captured by the mononuclear phagocyte system (MPS), or in other words by the reticuloendothelial system, resulting in rapid clearance from the circulation (2,3). Modification of the nanoparticle surface with poly(ethyleneglycol) (PEG) enables such nanoparticles to escape this uptake due to the steric barrier by which the PEG chain prevents interaction of the nanoparticles with opsonins and the cells responsible for MPS, such as Kupffer cells (stealth effect) (2–4). For example, doxorubicin-containing PEG-modified (PEGylated) liposomes are used clinically because, due to EPR effects, this formulation gives more potent anti-tumor activity and less drug-related toxicity than doxorubicin itself (5).

However, a pharmacokinetic issue for PEGylated liposomes, the so-called accelerated blood clearance (ABC) phenomenon, was recently revealed (6,7). In this phenomenon, a second dose of PEGylated liposomes is rapidly cleared from the circulation when administered within a certain time interval from the first dose injection due to their accelerated accumulation in the liver. This has been observed for a number of different animal species (8). The ABC phenomenon is of clinical concern because it decreases the

¹ Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan.

² DDS Institute, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan.

³ Division of Drug Delivery System, Institute of Medical Science, St. Marianna University, Kawasaki 216-8512, Japan.

⁴ Institute of Health Bioscience, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505, Japan.

⁵ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: mizu@gpo.kumamoto-u.ac.jp)

ABBREVIATIONS: ABC, Accelerated blood clearance; ADAM, 9-anthryldiazomethane; AUC, Area under the blood concentration-time curve; CL, Total body clearance; DEA, diethanolamine; EPR, Enhanced permeability and retention; FBS, Fetal bovine serum; ¹H-NMR, Proton nuclear magnetic resonance; HPLC, High-performance liquid chromatography; MPS, Mononuclear phagocyte system; MQW, Milli-Q water; Mw, Molecular weight; PBS, Phosphate-buffered saline; PEG, Poly(ethyleneglycol); PGE₁, Prostaglandin E₁; PLA, Poly(lactide); QOL, Quality of life; S.E.M., Standard error mean.

therapeutic efficacy of an encapsulated drug upon repeated administration and may cause adverse effects due to altered biodistribution of the drug. The time interval between repeated injections, the dose and physicochemical properties of the PEGylated liposomes and species of encapsulated drugs were shown to affect the extent of the ABC phenomenon (8–14). Although the mechanism causing the ABC phenomenon is still unclear, it was recently proposed that this phenomenon involves sequential events, including induction of anti-PEG IgM antibody production in the spleen by the first dose of PEGylated liposomes, complement activation by the IgM antibody and opsonization by C3 fragments following the second dose of PEGylated liposomes, and their uptake by MPS (6,11,14–18).

The number of patients with peripheral obstructive vascular diseases, such as arteriosclerosis obliterans, has increased in line with aging of the population and increases in the prevalence of diabetes and hyperlipidemia (19). While various clinical treatments, such as vascular bypass surgery, have been developed for these diseases, the prognosis is still not good. Prostaglandin E₁ (PGE₁), which has various physiological actions, such as vasodilation, angiogenesis and inhibition of platelet aggregation, serves as an effective treatment for peripheral obstructive vascular diseases (20–22). However, when administered systemically, PGE₁ also has related adverse effects, such as hypotension and diarrhea (21,23). Furthermore, in addition to its chemical instability (hydrolysis to PGA₁), PGE₁ is easily inactivated by 15-hydroxydehydrogenase during its passage through the lung (24–26). In order to overcome these issues, we developed lipo-PGE₁, a preparation incorporating PGE₁ into an oil-in-water lipid emulsion consisting of a soybean oil core and lecithin surfactant with a diameter of approximately 200 nm (27–29). Incorporation of PGE₁ into lipid emulsion protects PGE₁ from inactivation in the lung and enables the selective delivery of PGE₁ to damaged blood vessels, resulting in enhanced therapeutic effects and reduced drug-related toxicity (27,30). However, lipid emulsion cannot retain PGE₁ for a long period *in vivo* (4,31). Therefore, daily intravenous drip infusion is necessary for clinical treatment with lipo-PGE₁, which in turn requires patient hospitalization, resulting in a low quality of life (QOL).

We recently developed another formulation of PGE₁ in which the PGE₁ is encapsulated in biodegradable and biocompatible polymeric solid particles prepared with poly(lactide) homopolymer (PLA) and monomethoxy poly(ethyleneglycol)-PLA block copolymer (PEG-PLA). These particles have a mean diameter of 120 nm, which enhances the selective delivery of PGE₁ to damaged blood vessels due to the EPR effect (4). We also achieved a good sustained-release profile of PGE₁ from the nanoparticles, which may permit a longer-lasting therapeutic effect (4). The use of PEG-PLA enabled the nanoparticles to escape uptake by MPS (4). Based on these data, we proposed that PGE₁-encapsulated PEG-modified PLA-nanoparticles are of significant clinical benefit, because a single administration of this formulation may maintain a certain level of PGE₁ around damaged blood vessels for 1–2 weeks; in other words, repeated administration of this formulation with a time interval of 1–2 weeks to patients with peripheral obstructive vascular diseases may improve the symptom without patient hospitalization (4). However, prior to applying this formulation for

clinical use, it was necessary to test whether the ABC phenomenon is induced by these nanoparticles. In this study, we have found that the ABC phenomenon and the accompanying production of anti-PEG IgM antibody are induced by the intravenous administration of PGE₁-encapsulated PEG-modified PLA-nanoparticles. We successfully developed a modified formulation of the nanoparticles, which induces the ABC phenomenon *in vivo* to a lesser extent and shows a better sustained-release profile of PGE₁ *in vitro* than the original PGE₁-encapsulated PEG-modified PLA-nanoparticles.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Animals

L-PLA (Mw=20,000 or 33,000 on the catalogue) was from Taki Chemical Co. Ltd. (Kakogawa, Japan). The molecular weights of the polymers were determined by gel permeation chromatography and were slightly different from the molecular weights specified in the catalogue. The molecular weight of L-PLA (Mw=20,000 or 33,000 on the catalogue) was determined to be 17,500 or 28,100, respectively. PEG-D,L-PLA (average molecular weight of PEG and PLA are 5,600 and 9,400, respectively) was synthesized and evaluated as described previously (4). PGE₁ was purchased from Cayman Chemical Co. (Osaka, Japan). Iron chloride and 1,4-dioxane were purchased from Wako Pure Chemicals Industries Ltd. (Osaka, Japan). 9-anthryldiazomethane (ADAM) was purchased from Funakoshi Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Wistar rats (5–7 weeks old) were from Kyudo Co. Ltd. (Kumamoto, Japan). The rats were allowed free access to water and rat chow, and were housed under controlled environmental conditions (constant temperature, humidity and a 12 h dark-light cycle). The experiments and procedures described here were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the National Institutes of Health, and were approved by the Animal Care Committee of Kumamoto University.

Detection of PGE₁ by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

A Waters Alliance system running Empower software (Milford, MA) was used for HPLC analysis. Samples were separated using a 4.6×100-mm TSKgel Super-ODS column (Tosoh Co., Tokyo, Japan).

Solvent A (acetonitrile) and solvent B (Milli-Q water (MQW)) were used at a flow rate of 0.3 ml/min. Samples were incubated with ADAM at 37°C for 8 h. After injection of the sample (0 min), the mobile phase was changed as follows: 65% solvent A (25 min), a linear gradient of 65–100% solvent A (10 min) and then 100% solvent A (10 min). Fluorescence of ADAM reagent (excitation: 365 nm, emission: 412 nm) was detected using a 2475 Multi λ Fluorescence Detector.

ADAM is a fluorescent labelling reagent for carboxylic acids. ADAM is chemically unstable, but 9-anthrylmethyl ester derivative formed from ADAM and carboxylic acid is relatively stable (32). The derivative is sufficiently separated on a reversed-phase column and can be detected as reported

previously (4). The detection limit of PGE₁ in this method is approximately 50 ng/ml.

Preparation and Characterization of Nanoparticles

Nanoparticles were prepared by using the oil-in-water solvent diffusion method as described previously (4,33). L-PLA in 1,4-dioxane was mixed with PGE₁, PEG-D,L-PLA, iron chloride and diethanolamine (DEA) in acetone (the total amount of block copolymers and homopolymer was fixed at 25 mg). The different sizes of nanoparticles were prepared by altering the volume of 1,4-dioxane and acetone, as described previously (34). Samples were incubated for 10 min at room temperature and added to 25 ml of Milli-Q water (MQW) that stirred at 1,000 rpm. After addition of 0.5 ml of 0.5 M EDTA (pH 7.0) and 12.5 µl (62.5 µl for NP-L33s) of 200 mg/ml Tween 80, nanoparticles were purified and concentrated by ultrafiltration (Centriprep YM-50, Millipore Co., Billerica, MA). We have named the nanoparticles based on the isomer and molecular weight of PLA (from the catalogue). NP-L20 means nanoparticles (NP) prepared with L-PLA (L) of molecular weight 20,000 (as specified in the catalogue). NP-L20s means NP-L20 with a smaller particle size.

For determination of nanoparticle PGE₁ content, nanoparticles were dissolved in 150 µl of 1,4-dioxane and mixed with 150 µl of acetonitrile containing 3-phenylpropionate and 1.7 ml of 0.05 M EDTA (pH 3.6). After a 20 min incubation at room temperature, the solution was applied to a C18 reverse phase cartridge column (SepPak C18 200 mg, Waters, Milford, MA). After washing with 6 ml of MQW, PGE₁ was eluted with 3 ml of acetonitrile. The PGE₁ content was determined using HPLC, as described above. For determination of nanoparticle weight, the nanoparticle suspension was mixed with 0.05 M EDTA (pH 7.0) and centrifuged at 50,000 g for 30 min. The pellet was suspended in MQW, freeze-dried and weighed. The drug content was defined as the ratio of PGE₁ weight to the total weight of nanoparticles.

The PEG content of the nanoparticles was assayed as described previously (35) with some modifications. NaOH solution (4 N) was added to the nanoparticle suspension to give a final concentration of 0.8 N and incubated at 50°C for 24 h and neutralized by the addition of HCl solution (1 N). The mixtures were diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and, following the addition of iodine and potassium iodide, the absorbance was read at 520 nm.

Particle size and distribution were determined by the dynamic light scattering method (ZETASIZER Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK).

Pharmacokinetics of PGE₁-Encapsulated PLA-nanoparticles

The blood concentration profile of PGE₁ was monitored as described previously (4) with some modifications. PGE₁-encapsulated nanoparticles suspended in PBS were intravenously administered to rats via the tail vein. We used more than three rats for each group, and rats were assigned to each group, with the restriction that the groups were equated for average weight.

At the indicated periods, blood was collected from the tail vein using heparin-treated capillary tubes (Microhematocrit capillary tubes, Thermo Fisher Scientific, Yokohama,

Japan), and 50 µl of each blood sample was mixed with 400 µl of 1,4-dioxane and 50 µl of 10 mM EDTA (pH 7.0) to extract PGE₁ from the nanoparticles. The mixture was centrifuged at 13,400 g for 10 min. The supernatant (200 µl) was evaporated to dryness and dissolved in 500 µl of PGE₁ enzyme immunoassay (EIA) buffer (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Samples were centrifuged at 13,400 g for 2 min and the supernatant diluted appropriately. The PGE₁ content was determined using a PGE₁ EIA kit (R&D Systems Inc.) according to the manufacturer's protocol. AUC₍₀₋₂₄₎ is the area under the blood concentration-time curve from 0 to 24 h post-injection. The AUC₍₀₋₂₄₎ and total body clearance (CL) were calculated using the trapezium method by use of Microsoft Excel.

Determination of Anti-PEG IgM Antibody in Plasma

Quantification of IgM antibody reactive to PEG-PLA in plasma was determined by ELISA. All incubations were carried out at room temperature. PEG-PLA (10 nmol) in 50 µl ethanol was added to 96-well plates (EIA/RIA plate, AGC Techno Glass Co. Ltd., Funabashi, Japan) and air dried completely for 1 h. Then, 200 µl of blocking buffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl and 1% BSA) was added and incubated for 1 h, and the wells were washed three times with washing buffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl and 0.05% Tween 20). Plasma obtained by centrifugation (15 min, 2,700 g) of collected blood samples was then diluted appropriately and added to the wells to incubate for 1 h. The wells were washed five times with the washing buffer, and 100 µl of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (0.2 µg/ml, goat anti-rat IgM IgG-HRP conjugate, Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX) in blocking buffer containing 0.05% Tween 20 was added to each well. After incubation for 1 h, the wells were washed five times with washing buffer. Coloration was initiated by adding *o*-phenylene diamine (1 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO) and stopped by adding 100 µl of 2 M H₂SO₄ after a 5 min incubation. The absorbance was measured at 490 nm using a Microplate reader (FLUOstar, BMG LAB-TECH Ltd., Offenburg, Germany).

RESULTS

Induction of the ABC Phenomenon and Production of Anti-PEG IgM Antibody

In general, hydrophilic drugs such as PGE₁ are very hard to encapsulate in PLA-nanoparticles. We recently succeeded in encapsulating PGE₁ by precipitating PGE₁ with iron ions (4). In that previous report, we prepared various types of PLA-nanoparticles. Of them, NP-L20, which was prepared with L-PLA (Mw=17,500) and PEG-D,L-PLA and had a mean diameter of 120 nm, showed a good sustained-release profile of PGE₁ (the half life *in vitro* was about 10 days), a relatively good efficiency of encapsulation (about 1% drug content) and a long blood residence time (4). Thus, in the current study, we have tested whether NP-L20 induces the ABC phenomenon.

We estimated the clinical dose of PGE₁-encapsulated nanoparticles is 120 µg PGE₁ for individual human (about 2 µg PGE₁/kg) because lipo-PGE₁ at 5-10 µg PGE₁/day is

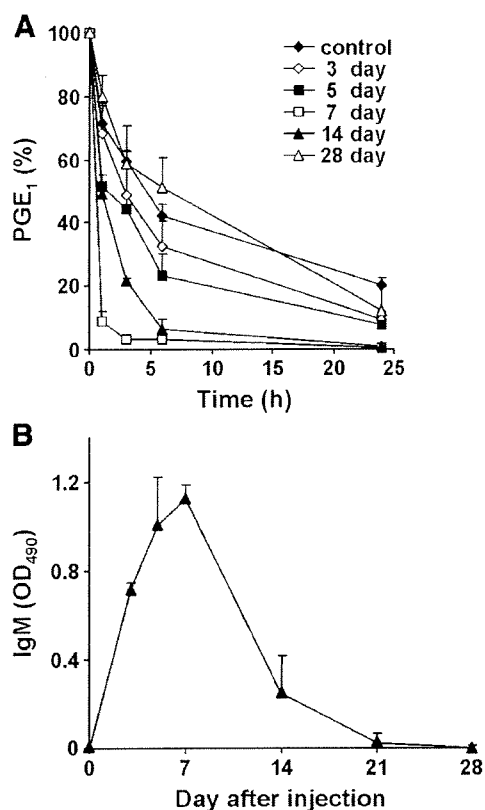


Fig. 1. Induction of the ABC phenomenon and production of anti-PEG IgM antibody by repeated administration of NP-L20. **A** Rats were intravenously administered NP-L20 (50 μ g nanoparticles/rat). At 3, 5, 7, 14 or 28 days after the injection, NP-L20 (1,000 μ g nanoparticles/rat) was intravenously administered. Plasma PGE₁ levels were monitored after injection of the second dose as described in the "Materials and Methods" and shown relative to the initial level. As a control, alteration of plasma PGE₁ levels following administration of NP-L20 (1,000 μ g nanoparticles/rat) to naïve rats is shown. Values are given as mean \pm S.E.M. ($n=3-10$) **B** Rats were intravenously administered NP-L20 (50 μ g nanoparticles/rat) and blood samples were prepared periodically. The amount of anti-PEG IgM antibody was determined by ELISA as described in "Materials and Methods." Values are mean \pm S.E.M. ($n=3$).

used clinically, and we assumed that the sustained-release formulation would be delivered as one injection per 2 weeks. Thus, we used a dose of 50 μ g NP-L20 for individual rat (about 2 μ g PGE₁/kg) for the first injection. We examined the

pharmacokinetics of PLA-nanoparticles by determining the plasma level of PGE₁; a pilot study revealed that about 1,000 μ g NP-L20 (about 10 μ g PGE₁) was required for this detection (data not shown). Therefore, we used a dose of 1,000 μ g NP-L20 for individual rat for the second injection. However, it is possible that the increased dosing results in higher uptake by liver and leads to clearance.

Rats were administered NP-L20 twice at a time interval of 3, 5, 7, 14 or 28 days, and the pharmacokinetic behaviour (blood clearance profile) of the second dose of NP-L20 was investigated by measuring plasma concentration of PGE₁, and the behaviour was compared to that without a prior injection (control). As shown in Fig. 1A, compared to the control, more rapid clearance of NP-L20 was observed after injection of the second dose, indicating that the ABC phenomenon was induced by the injection of the first dose. The ABC phenomenon was most apparent at the time interval of 7 days between the first and second injections, and the phenomenon was not so apparent at a time interval of 3 or 14 days, showing that the ABC phenomenon induced by PEG-modified PLA-nanoparticles is dependent on the time interval, as reported for PEGylated liposomes (14). A strong inverse relationship between the dose of initially injected PEGylated liposomes and the extent of the ABC phenomenon was reported (10,36). But we found that induction of the ABC phenomenon by NP-L20 was not so clearly affected by the initial dose (from 1 μ g to 1 mg NP-L20; data not shown).

We also measured the plasma levels of IgM antibodies reactive to PEG-PLA after injection of 50 μ g NP-L20 by use of a modified ELISA with PEG-PLA-coated 96-well plates. The production reached its maximum level at day 7 post-injection and returned to the original level until day 28 post-injection (Fig. 1B). This time course correlates with the time course for induction of the ABC phenomenon (Fig. 1A), suggesting that IgM antibodies reactive to PEG-PLA are responsible for the ABC phenomenon. However, the amount of anti-PEG IgM antibody did not completely correlate with the level of ABC phenomenon: the level of IgM antibody at day 3 after the injection of first dose was higher than that at day 14 after, whereas the level of the ABC phenomenon showed the opposite trend (Fig. 1).

When the ELISA was performed with PLA-coated wells, production of IgM antibodies was not observed, (data not shown). On the other hand, when the ELISA was performed with PEG-coated wells, production of IgM antibodies was observed; however, the level was less than that observed with PEG-PLA-coated plates (data not shown), suggesting that the

Table I. Characteristics of PGE₁-Encapsulated PLA-nanoparticles Containing Different Amounts of PEG

Codes	L-PLA Mw (kDa)	PEG content (%)	PGE ₁ content (%)	Particle size (nm)
PEG 0	17.5	0	1.01 \pm 0.14	154 \pm 4
PEG 7	17.5	5.4 \pm 0.5	0.86 \pm 0.09	120 \pm 2
PEG11	17.5	9.8 \pm 0.9	0.60 \pm 0.03	110 \pm 3
PEG18	17.5	12.8 \pm 0.3	0.92 \pm 0.34	109 \pm 3
PEG30	17.5	23.7 \pm 1.2	1.11 \pm 0.10	119 \pm 2

Nanoparticles encapsulating PGE₁ were prepared with L-PLA (Mw=17 500)/PEG-D,L-PLA (25 mg/0 mg, 22 mg/3 mg, 21 mg/4 mg, 18 mg/7 mg and 13 mg/12 mg for preparation of PEG0, PEG7, PEG11, PEG18 and PEG30 (NP-L20), respectively) in the presence of 5 mg PGE₁, 1.2 mg iron chloride and 4.8 mg DEA by an oil-in-water solvent diffusion method. The amounts of PEG in prepared nanoparticles were determined and the PEG content (w/w) is shown. PGE₁ content and nanoparticle size were determined as described in "Materials and Methods." Values are mean \pm S.E.M. ($n=3$).

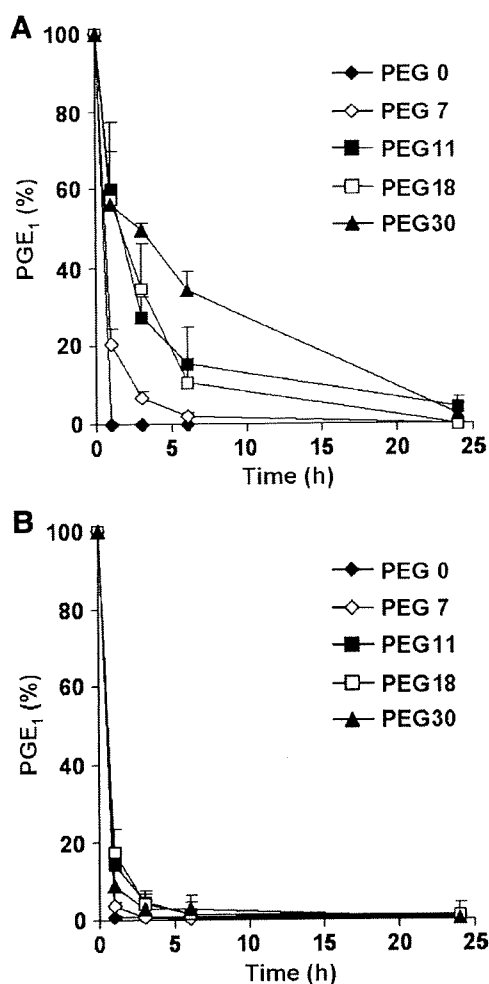


Fig. 2. The effect of PEG content of PLA-nanoparticles on their clearance from the circulation and on induction of the ABC phenomenon. **A** Various types of nanoparticles (PEG0, PEG7, PEG11, PEG18 and PEG30 (NP-L20)) were prepared as described in the legend of Tables I and II. Rats were intravenously administered PEG0, PEG7, PEG11, PEG18 or PEG30 (133 μg PGE₁/kg). Plasma PGE₁ levels were monitored and are shown as described in the legend of Fig. 1. Values are mean \pm S.E.M. ($n=3-4$) **B** Rats were intravenously administered PEG0, PEG7, PEG11, PEG18 or PEG30 (50 μg nanoparticles/rat). After 7 days, the same type of nanoparticles (1,000 μg nanoparticles/rat) was administered and the amount of PGE₁ in plasma was monitored and shown as described above. Values are mean \pm S.E.M. ($n=3-6$).

induced IgM antibodies recognize PEG rather than PLA, as reported for PEGylated liposomes (11).

Effect of the PEG Content of Nanoparticles on Induction of the ABC Phenomenon

It was reported that PEG content in PEGylated liposomes affects induction of the ABC phenomenon (36). Here we prepared PGE₁-encapsulated nanoparticles in the presence of various ratios of PLA and PEG-PLA (PEG30 means the nanoparticles prepared in the presence of 30% PEG (*w/w*); the real content of PEG in the prepared nanoparticles is shown in Table I). The particle size and the efficiency of encapsulation

(PGE₁ content in nanoparticles) were similar for these types of nanoparticles (PEG0, PEG7, PEG11, PEG18 and PEG30), except that the particle size of PEG0 was larger than other types of nanoparticles (Table I).

We first examined the blood clearance profiles of the various types of nanoparticles following their intravenous injection into naïve rats in an attempt to understand their stealth effects. As shown in Fig. 2A, more rapid clearance from the circulation was observed with nanoparticles with lower PEG content, confirming that PEG confers the stealth effect of PLA-nanoparticles. Pharmacokinetic parameters ($\text{AUC}_{(0-24)}$ and CL) support this notion: approximately, $\text{AUC}_{(0-24)}$ became higher but CL became lower with the increase in the PEG content of nanoparticles (Table II). We then examined induction of the ABC phenomenon by these types of nanoparticles in a manner similar to the experiment summarized in Fig. 1A. Injection of a second dose of each of any of the types of nanoparticles at the time interval of 7 days resulted in very rapid clearance from the circulation (Fig. 2B). To evaluate the ABC phenomenon, we calculated the ratio of $\text{AUC}_{(0-24)}$ for the second injection (Fig. 2B) to that of the first one (Fig. 2A) as the ABC index; a value of 1 for this index means no induction of the ABC phenomenon. As shown in Table II, the ABC indexes for all types of nanoparticles except PEG0 were less than 1, and there is no apparent relationship between PEG content and the ABC index, showing that PEG-modified PLA-nanoparticles induce the ABC phenomenon irrespective of their PEG content. Based on the results in Fig. 2 and Table I, we fixed the PEG content at 30% because this achieved a good stealth effect, and we tried to find another way to suppress the ABC phenomenon.

Effect of Particle Size and Molecular Weight of PLA in Nanoparticles on Induction of the ABC Phenomenon

For PEGylated liposomes, it was reported that their size and physicochemical properties affect their ability to induce the ABC phenomenon (8). We have also reported that use of L-PLA of higher molecular weight improves the sustained-release profile of PGE₁ from nanoparticles (4). Thus, we prepared various types of nanoparticles with different diameters and compositions (NP-L20s, NP-L33 and NP-L33s). NP-L33 and NP-L33s were prepared from L-PLA ($M_w=28,100$), and NP-L20s and NP-L33s have a smaller particle size than NP-L20 and NP-L33 (Table III). The efficiency of encapsulation of PGE₁ was lower in nanoparticles with smaller size or

Table II. Characteristics of PGE₁-Encapsulated PLA-nanoparticles Containing Different Amounts of PEG

Codes	$\text{AUC}_{(0-24)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	CL ($\text{ml}/\text{h}\cdot\text{kg}$)	ABC index
PEG 0	0.39 ± 0.13	401.0 ± 97.7	1.43 ± 0.14
PEG 7	0.93 ± 0.07	143.9 ± 10.5	0.53 ± 0.02
PEG11	3.22 ± 0.66	45.5 ± 10.4	0.24 ± 0.04
PEG18	2.98 ± 0.51	47.9 ± 9.8	0.41 ± 0.08
PEG30	6.34 ± 0.58	21.5 ± 2.0	0.20 ± 0.04

Pharmacokinetic parameters were calculated by moment analysis of the results shown in Fig. 2A. The ABC index was calculated as follows: ABC index = AUC of the second dose (Fig. 2B)/ AUC of the first dose (Fig. 2A). Values are mean \pm S.E.M. ($n=4$).

Table III. Characteristics of Various PGE₁-Encapsulated Nanoparticles with Different Diameters and Compositions

Codes	L-PLA Mw (kDa)	PEG content (%)	PGE ₁ content (%)	Particle size (nm)
NP-L20	17.5	23.7±1.2	1.11±0.10	119±2
NP-L20s	17.5	28.7±1.8	0.86±0.04	81±6
NP-L33	28.1	30.4±0.8	0.83±0.17	134±4
NP-L33s	28.1	23.8±1.6	0.20±0.01	69±2

Nanoparticles encapsulating PGE₁ were prepared with 13 mg L-PLA (Mw=17 500) or L-PLA (Mw=28 100) and 12 mg PEG-D,L-PLA in the presence of 5 mg PGE₁, 1.2 mg iron chloride and 4.8 mg DEA by an oil-in-water solvent diffusion method. The nanoparticles were characterized as described in the legend of Tables I and II. Values are given as mean ± S.E.M. (*n*=3).

in those prepared from longer L-PLA (Table III). As a result, the PGE₁ content of NP-L33s was less than one-fifth of that of NP-L20 (Table III). At first, we compared the induction of anti-PEG IgM antibody after injection of these types of nanoparticles. As shown in Fig. 3A, compared to NP-L20, NP-L33s induced anti-PEG IgM antibody production to a lesser extent: the maximum level was lower and the level returned to the original level more rapidly. In addition, the induction of anti-PEG IgM antibody by NP-L20s or NP-L33 was less apparent than that by NP-L20; however, the difference was not as apparent as for NP-L33s (Fig. 3A).

We then examined induction of the ABC phenomenon by the various types of nanoparticles. As well as NP-L20, NP-L20s and NP-L33 gave rise to the ABC phenomenon when the second dose was injected at day 7 or 14 after injection of the first dose. However, they induced the phenomenon to a lesser extent than NP-L20 (Fig. 3B and Table IV). In contrast, NP-L33s did not exhibit the ABC phenomenon when the second dose was injected at day 14 after the first injection (Fig. 3B and Table IV). The ABC phenomenon was not apparent for any of the nanoparticles when the second dose was injected at day 28 after the injection of first dose (Fig. 3B and Table IV). The results for the ABC phenomenon shown in Fig. 3B correlate well with the induction of anti-PEG IgM antibody production shown in Fig. 3A, supporting the notion that anti-PEG IgM antibody is responsible for the ABC phenomenon. The results in Fig. 3B also show that NP-L33s has the better stealth effect than NP-L20 (Table IV).

Release Profile of PGE₁ from Nanoparticles *In Vitro*

Considering the clinical setting, the time interval of repeated injections of PGE₁-encapsulated nanoparticles could be prolonged with improvement of the sustained-release profile of PGE₁. Thus, we examined the release profile of PGE₁ from the NP-L20, NP-L20s, NP-L33 and NP-L33s upon incubation at 37°C in 50% fetal bovine serum (FBS) *in vitro* (Fig. 4). Since the concentration of PGE₁ in the medium (i.e. released PGE₁) was below the limits of detection in the preliminary experiment, the amount released was determined by measuring the PGE₁ remaining in the particles. We separated the nanoparticles from the medium by centrifugation (69,000 g for 30 min).

As shown in Fig. 4, NP-L20 showed a release profile similar to that observed in a previous paper (4) and more than half of the encapsulated PGE₁ was released from NP-L20 within 14 days. As suggested in previous reports (37,38), use of PLA with higher molecular weight resulted in a better sustained-release profile (Fig. 4). Furthermore, although the

underlying mechanism is unknown, NP-L20s and NP-L33s showed better sustained-release profiles than NP-L20 and NP-L33, respectively (Fig. 4). This result is surprising, because it is generally believed that drug release from smaller size particles is faster due to the higher surface area. One possible explanation is that the distribution of PGE₁ in nanoparticles is not uniform and this distribution is affected by size of nanoparticles. Nevertheless, NP-L33s showed the best sustained-release profile, and more than half of the encapsulated PGE₁ remained in NP-L33s even after incubation for 28 days. These results suggest that NP-L33s is beneficial, not only because it results in less ABC phenomenon-inducing activity but also because it exhibits a better sustained-release profile of encapsulated PGE₁.

DISCUSSION

In order to develop a new formulation of PGE₁ that enables targeting and sustained-release drug delivery, we incorporated PGE₁ into PEG-modified PLA-nanoparticles (4). Before applying this formulation to a clinical setting, it is necessary to test whether it induces the ABC phenomenon, because this phenomenon may decrease the therapeutic efficacy of an encapsulated drug upon repeated administration. Consequently, in this study, we found that the ABC phenomenon is induced by the PEG-modified PLA-nanoparticles. Furthermore, we examined the mechanism underlying this phenomenon and could develop modified PGE₁-encapsulated nanoparticles that are less active in inducing the ABC phenomenon and show a better sustained release profile for encapsulated PGE₁.

The ABC phenomenon was identified for PEGylated liposomes, and its mechanism has been studied extensively for these liposomes (8). It was recently reported that the ABC phenomenon can also be induced by polymeric micelles (39,40). Here we have shown that the phenomenon can be induced by PEG-modified PLA nanoparticles, suggesting that the phenomenon is induced not specifically by PEGylated liposomes but generally by PEG-modified nanoparticles. Although it was reported that production of anti-PEG IgM antibody is induced by PEG-modified proteins in humans (41), it is not clear whether the ABC phenomenon is induced in humans. However, this possibility should be considered when PEG-modified nanoparticles are applied clinically in repeated intravenous administration.

Here we have examined which factors (time interval, dose, PEG content, molecular weight of PLA and particle size) affect induction of the ABC phenomenon by PEG-modified PLA-nanoparticles, referring to results for PEGy-

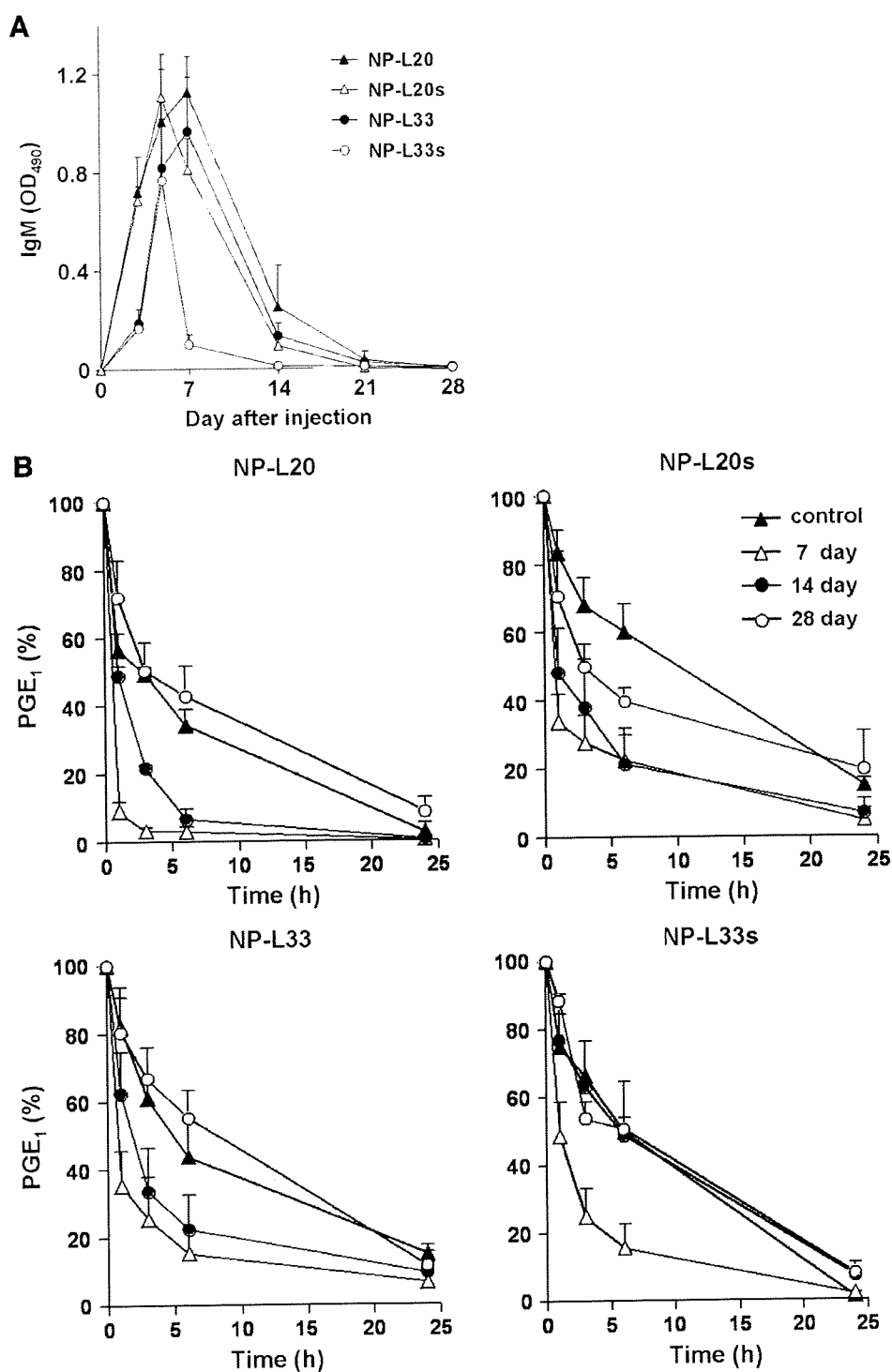


Fig. 3. Effect of molecular weight of L-PLA and particle size on induction of the ABC phenomenon and production of IgM antibody. **A** Various types of nanoparticles (NP-L20, NP-L20s, NP-L33 and NP-L33s) were prepared as described in the legend of Tables III and IV. Rats were intravenously administered each type of nanoparticle (50 μ g nanoparticles/rat), and blood samples were taken periodically. The amount of anti-PEG IgM antibody was determined as described in the legend of Fig. 1. The NP-L20 data are the same as those in Fig. 1B. Values are mean \pm S.E.M. ($n=3-4$). **B** Rats were intravenously administered each type of nanoparticle (50 μ g nanoparticles/rat). At days 7, 14 or 28 days after the first injection, the same type of nanoparticles (1,000 μ g nanoparticles/rat) was administered and the plasma PGE₁ levels were monitored and shown as described in the legend of Fig. 1. As a control, changes in plasma PGE₁ levels after the administration of each type of nanoparticles to naïve rats are shown. Values are mean \pm S.E.M. ($n=3-7$).

Table IV. Characteristics of Various PGE₁-Encapsulated Nanoparticles with Different Diameters and Compositions

Codes	AUC ₍₀₋₂₄₎ (μg·h/ml)	CL (ml/h·kg)	ABC index		
			7 day	14 day	28 day
NP-L20	6.35±0.58	21.5±2.0	0.17±0.03	0.39±0.04	1.26±0.25
NP-L20s	8.11±0.72	16.8±1.3	0.40±0.12	0.45±0.17	0.80±0.13
NP-L33	6.55±1.24	21.6±3.4	0.42±0.17	0.60±0.22	1.19±0.16
NP-L33s	7.59±0.76	18.0±1.8	0.43±0.12	1.06±0.19	1.07±0.05

Pharmacokinetic parameters were calculated based on the results shown in Fig. 3. The results were analysed as described in the legend of Tables I and II. Values are shown as mean ± S.E.M. (n=4).

lated liposomes. The time interval between injections clearly affected the ABC phenomenon: repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles with a time interval of 7 days showed strongest induction of the phenomenon. Similar results were obtained for PEGylated liposomes (14). Doses (data not shown) or PEG content (Fig. 2) of the nanoparticles that were initially injected did not affect induction of the ABC phenomenon within the ranges of 1–1,000 μg PLA-nanoparticles (0.002–0.2 μmol PLA/kg) or 7–30% PEG content, respectively. Doses of the nanoparticles injected did not affect induction of the anti-PEG IgM antibodies within the ranges of 1–1,000 μg nanoparticles (data not shown). It was reported that a strong inverse relationship between the dose of initially injected PEGylated liposomes and the extent of the ABC phenomenon within the range of 0.001–5 μmol phospholipid/kg was observed and that PEG density beyond 5% suppressed induction of the ABC phenomenon (36). Thus, the effects of dose and PEG content of the initially injected nanoparticles on induction of the ABC phenomenon seem to differ depending on the types of nanoparticles. Smaller PEG-modified PLA-nanoparticles tended to induce the phenomenon to a lesser extent, which is in contrast to results observed for PEGylated liposomes (9). We also found that nanoparticles prepared from L-PLA (Mw=28,100) are less active for induction of the ABC phenomenon than those derived from L-PLA (Mw=17,500).

As for the mechanism for induction of the ABC phenomenon by PEG-modified PLA-nanoparticles, we suggest that anti-PEG IgM antibodies play an important role. The reason for this is that induction of anti-PEG IgM antibody by the first dose of nanoparticles and the magnitude of the ABC phenomenon observed after the second dose was generally well correlated. As pointed out for PEGylated liposomes (6,11,14–18), anti-PEG IgM antibodies induced by the first dose of PEG-modified PLA-nanoparticles may activate the complement system and opsonization by C3 fragments on the second dose, resulting in their uptake by MPS. However, the amount of anti-PEG IgM antibody did not completely correlate with the level of ABC phenomenon, as described above. Thus, a mechanism other than induction of production of anti-PEG IgM antibody may also be involved in this ABC phenomenon for PEG-modified PLA-nanoparticles.

Considering the potential clinical application of PGE₁-encapsulated PEG-modified PLA-nanoparticles, factors other than the ABC phenomenon (such as stealth effects and sustained-release profile) are also important. From this point of view, we propose that NP-L33s may be clinically beneficial

as a targeted and sustained-release formulation of PGE₁ based on the following results from this study: (i) NP-L33s caused the weakest induction of production of anti-PEG IgM antibody and ABC phenomenon of the various types of nanoparticles, and no apparent ABC phenomenon was observed when these nanoparticles were repeatedly injected at an interval of 14 days; (ii) NP-L33s showed good stealth effect; (iii) NP-L33s showed the best sustained-release profile *in vitro*, and more than half of the encapsulated PGE₁ remained in the nanoparticles even after incubation for 28 days. Thus, if NP-L33s delivered to damaged blood vessels *in vivo* shows a similar sustained-release profile, it might keep the desired level of PGE₁ around the vessels upon repeated injection of once per 2 weeks or once per month without induction of the ABC phenomenon. However, since the optimum time interval for induction of the ABC phenomenon differs depending on the animal species for PEGylated liposomes (8,13), induction of the ABC phenomenon by NP-L33s in humans also needs to be examined.

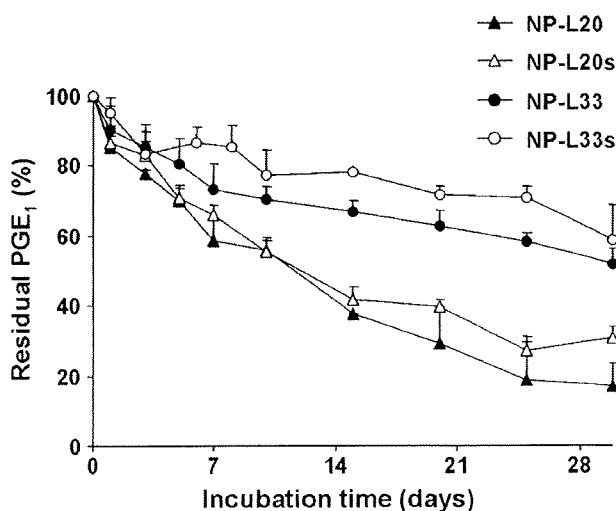


Fig. 4. Release profile of PGE₁ from nanoparticles *in vitro*. Various types of nanoparticles (NP-L20, NP-L20s, NP-L33 and NP-L33s) were prepared as described in the legend of Tables III and IV. Nanoparticles (at a particle concentration of 10 mg/ml) were dispersed in 50% FBS in PBS (*v/v*, 100 μl) and incubated at 37°C for the indicated periods. The PGE₁ content remaining in the nanoparticles as a function of time was determined by HPLC. Values shown are mean ± S.E.M. (n=6).