

A, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A.  
Reduction of Neu5GC Xenoantigen on human  
ADSC/MSCs lead to them as safer and more  
useful cell sources for realizing various stem  
cell therapies. *Tissue Engineering Part A*  
2010 Apr; 16(4):1143-1155

2) Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A,  
Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N,  
Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S,  
Komoda H, Okano T, Sawa Y.  
Cardiomyoblast-like cells differentiated from  
human adipose tissue-derived mesenchymal  
stem cells improve left ventricular dysfunction  
and survival in a rat myocardial infarction  
model. *Tissue Engineering Part C Methods*  
2010 Jun; 16(3): 417-425

3) Okura H, Komoda H, Saga A,  
Kakuta-Yamamoto A, Hamada Y, Fumimoto Y,  
Lee CM, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A.  
Properties of Hepatocyte-like Cell Clusters  
Derived from human adipose tissue-derived  
mesenchymal stem cells. *Tissue  
Engineering Part C Methods* 2010 Aug;  
16(4): 761-770

4) Iwahori K, Serada S, Fujimoto M,  
Nomura S, Osaki T, Lee CM, Mizuguchi H,  
Takahashi T, Ripley B, Okumura M, Kawase  
I, Kishimoto T, Naka T. Overexpression of  
SOCS3 exhibits preclinical antitumor activity  
against malignant pleural mesothelioma. *Int  
J Cancer* 2010 Oct 14. Epub ahead of print

5) Inoue M, Lee CM, Ono K, Suzuki M,  
Tokunaga T, Sawa Y, Okumura M. Clinical

Effectiveness of Boron Neutron Capture  
Therapy for a Recurrent Malignant  
Peripheral Nerve Sheath Tumor in the  
Mediastinum. *J Thorac Oncol.* 2010 Dec:  
5(12): 2037-2038

6) Fujii H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai  
M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kirihata M,  
Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM.  
Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium  
borocaptate improved the BNCT efficacy for  
liver tumors in *in vivo*. *Radiat Oncol.* 2011 Jan  
20; 6: 8

7) Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M,  
Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM,  
Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T,  
Matsuyama A. Transplantation of human  
adipose tissue-derived multilineage  
progenitor cells reduced serum cholesterol in  
hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue  
Engineering Part C Methods* 2011 Feb;  
17(2): 145-154

## 2. 学会発表

- 1) 松田貴之、宇山 浩、李 千萬  
ポリ-γグルタミン酸をマトリックスとするシス  
プラチン徐放製剤の開発  
第 32 回日本バイオマテリアル学会大会 広島  
2010 年 11 月 3 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

新規ナノデバイスの製造方法ならびにそれを用  
いたホウ素製剤に関する特許出願予定。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）  
分担研究報告書

ホウ素ナノデバイスの膀胱がん適応に関する研究

研究分担者 鈴木 実 京都大学原子炉実験所・特定准教授

研究要旨

2種のトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイス、Tf-ホウ素脂質、BSH-Tf-リン脂質リポソームを使用し、ヒト膀胱癌細胞に対する細胞内取り込みを検討した。BSH-Tf-リン脂質 1,000 ppm、Tf-ホウ素脂質 1,000 ppm を1時間暴露後の細胞内ホウ素濃度は、3.5、5.0・g/10x10<sup>8</sup> cells と極めて高濃度の細胞内取り込みが確認された。また、濃度依存性に細胞内取り込みが高くなることが確認された。マウスを用いた BSH-Tf-リン脂質 Tf-ホウ素脂質リポソームを用いたホウ素中性子捕捉療法（BNCT）の毒性試験を実施した。細胞内取り込み試験の条件をマウス照射実験で再現し、マウス膀胱に両ナノデバイス 1,000 ppm を膀胱内投与後1時間保持し PBS で2度膀胱内を洗浄後、30分の中性子照射を施行した。照射後3カ月の時点で犠牲死させマウス膀胱壁の線維化の有無を検討したところ、全く膀胱壁には線維化の所見は認められなかった。

トランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイスのヒト膀胱癌細胞への極めて高い細胞内取り込みが確認されたことと、細胞実験と同条件で施行したマウス照射実験により、膀胱照射において最も問題となる晩期有害事象である萎縮膀胱の原因となる壁の線維化が認められなかったことの2点は、臨床試験開始に向けて非常に重要な知見である。

A. 研究目的

平成22年度は、以下の2つの研究を実施した。  
それぞれの研究目的は以下の通りである。

1. 2種のトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイス、Tf-ホウ素脂質リポソーム、BSH-Tf-リン脂質リポソームを使用し、ヒト膀胱癌細胞に対する細胞内取り込みを検討した。
2. 1. で用いた2種のホウ素ナノデバイスを用いて、細胞実験と同じ条件を再現するように、まず膀胱内にホウ素ナノデバイスを膀胱内投与し、中性子線を照射し、晩期有害事象である膀胱壁の線維化が発生する階中を検討した。
- 3.

B. 研究方法

1. ホウ素ナノデバイスのヒト膀胱がん細胞への取り込みの検討

平成21年度の研究結果で、1,000 ppm の高濃度で細胞毒性を示さなかった2種類のトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイスである Tf-ホウ素脂質リポソーム（以下、Tf-DSBL Liposome）、BSH-Tf-リン脂質リポソーム（以下、Tf-DSPC Liposome+BSI）を使用した。

対象とする細胞には、ヒト膀胱癌細胞である KU-7 細胞に蛍光タンパク GFP を発現させた KU7-GFP 細胞を使用した。各ホウ素ナノデバイスの KU7-GFP 細胞への取り込みと細胞内の局在について検討した。

実験方法は、KU7-GFP 細胞を接着させた dish に 10, 30, 100, 300, 1000 ppm のホウ素ナノデバイスを 60 分間、曝露した後に、PBS で3回リンスした後、ICP にて細胞内ホウ素濃度を計測した。対象として BSH についての検討を加えた。また、ホウ素ナノデバイスの細胞内取り込みを確認する目的で、蛍光物質である PKH26 を封入したホウ素脂質リポソーム（PKH26-DSBL Liposome）を用いて、細胞内取り込み試験と同様の条件で実験を

施行した。

2. マウス膀胱に対する照射実験

1. と同じホウ素ナノデバイスである 1,000 ppm の濃度の Tf-DSBL Liposome と Tf-DSPC Liposome+BSH、100 μ を 2A ゲージのカテーテルを用いて経尿道的に投与し、60 分間保持し、その後 PBS で 2 回洗浄後、直ちに京都大学原子炉実験所研究炉重水設備で 30 分間中性子を照射した。対照群として、ホウ素を含まない Tf-DSPC Liposome 投与+照射群と非照射群として、Tf-DSPC-Liposome+BSH 投与のみと Tf-DSPC 投与のみの 2 群を加えた。

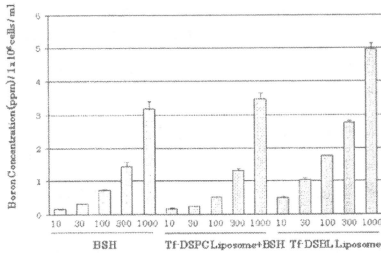
照射後 3 カ月の時点でマウスを犠牲死させ膀胱を切り出し、マウス膀胱壁の線維化の有無を検討する目的にて、HE 染色およびマッソントリクローム染色を実施した。

C. 研究結果

1. ホウ素ナノデバイスのヒト膀胱がん細胞への取り込み

BSH、Tf-DSPC-Liposome+BSH、Tf-DSBL Liposome 全ての群において、投与する濃度依存性に細胞内へのホウ素ナノデバイスの取り込みが増加することがかくにんされた。1,000 ppm の高濃度の曝露で、BSH 群は 3.18 μg/1x10<sup>6</sup> cells、Tf-DSPC-Liposome+BSH 群は 3.47 μg/1x10<sup>6</sup> cells、Tf-DSBL Liposome は最も取り込みが大きく、4.97 μg/1x10<sup>6</sup> cells であった。(図 1 参照)

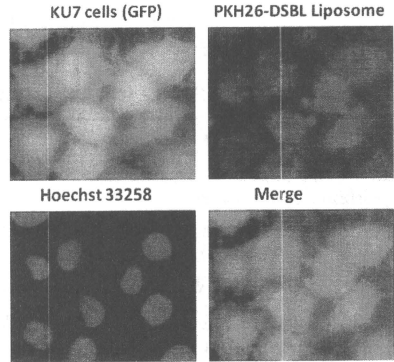
図 1



また蛍光物質を封入した PKH26-DSBL Liposome を用

いた検討で、ホウ素ナノデバイスは、図 2 に示すように、Endocytosis により細胞室内に局在することが明らかになった。

図 2



2. マウス膀胱に対する照射実験

結果は表 1 にまとめた。

照射条件	非照射				照射			
	BSH	Tf-DSPC	Tf-DSBL	PKH26-DSBL	BSH	Tf-DSPC	Tf-DSBL	PKH26-DSBL
照射前	+	+	+	+	+	+	+	+
照射後	+	+	+	+	+	+	+	+
照射後 3 カ月	+	+	+	+	+	+	+	+
照射後 6 カ月	+	+	+	+	+	+	+	+
照射後 9 カ月	+	+	+	+	+	+	+	+
照射後 12 カ月	+	+	+	+	+	+	+	+

表 1. マウス膀胱に対する照射実験の結果

表 2. マウス膀胱に対する照射実験の結果

非照射群において、リポソーム投与単独においては、特に病理組織学的に異常所見は認められなかった。

照射群においては、BSHを含むTf-DSPC-Liposome+BSH群、Tf-DSBL Liposome群、BSHを含まないTf-DSPC Liposome群において、全ての個体において特に異常所見なく、マッソントリクローム染色においても膀胱壁の線維化の所見は認められなかった。

以下、Tf-DSPC Liposome BSH群(図3)とTf-DSBL Liposome群(図4)の病理組織写真を提示する。

図3

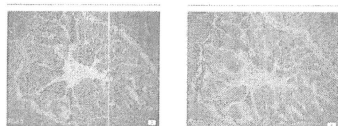
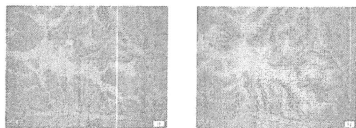


図4



両群の個体ともに、粘膜固有層の膠原線維量に増減を認めなかった。また、筋層の平滑筋束間の膠原線維量の増減も認められなかった。

#### D. 考察

##### 1. ホウ素ナノデバイスのヒト膀胱がん細胞への取り込み

本研究で対象疾患としている膀胱上皮内癌、膀胱上皮に癌細胞が均広がり、膀胱内腔に直接癌細胞が露出している状況である。従って、今回のdishに接着したヒト膀胱がん細胞に高濃度のホウ素ナノデバイスを曝露させる条件は、膀胱内に尿道カテーテルを用いて直接高濃度のホウ素ナノデバイスを投与し一定時間保持した状態を再現しているといえる。Dish上のがん細胞の実験結果が、実際の膀胱がんの取り込みを検討する上

で、大変重要な情報を提供することになる。

今回、2種のホウ素ナノデバイス、Tf-DSPC Liposome+BSH, Tf-DSBL Liposome 1,000 ppmの曝露で3-4  $\mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{ cells}$  という極めて高い細胞内濃度が達成された。現在まで報告された同種の細胞内取り込み試験と比較して、10倍以上の高濃度である。その最大の理由は、通常の細胞内取り込み試験では、臨床で用いられることを想定して、ホウ素化合物は全身静脈内投与されることから血中のホウ素濃度を想定した濃度10-100 ppmで曝露されることが多い。今回の膀胱上皮内癌に対して、ホウ素化合物を膀胱内に直接投与することにより、癌細胞が極めて高濃度のホウ素化合物に曝露される状況というのは、他の部位の癌ではあり得ない。従って、今年度の研究により、高濃度のホウ素ナノデバイスを曝露することにより、腫瘍細胞内に高濃度のホウ素濃度が達成可能であったことから、膀胱上皮内癌に対してBNCTは有効な治療法の1つの選択肢としてなり得る重要な知見が得られた。

##### 2. マウス膀胱に対する照射実験

膀胱癌に対する放射線治療で最も問題となるのは、晩期有害事象とされる萎縮膀胱である。この有害事象は、放射線により膀胱壁に線維化が起こり膀胱容量が小さくなってしまい、状況によっては膀胱を全摘することにつながってしまう有害事象である。

我々が想定する膀胱上皮内癌の転移は、高濃度のホウ素ナノデバイスを膀胱内に直接投与することであり、当然、正常膀胱粘膜も高濃度のホウ素ナノデバイスに曝露されることになる。しかし、BNCTにおける照射の中心となるアルファ線と反跳リチウム原子核の飛程は細胞1個分であり、反応は膀胱粘膜でとどまることから、急性期の粘膜反応は出現しても、晩期の有害事象は発生しないことを予想していた。1,000 ppmのTf-DSPC-Liposome+BSH群、Tf-DSBL Liposome群の照射実験において、3カ月の時点で全く膀胱壁に線維化が認められなかったことは、我々の予想を裏付ける結果であり、臨床試験に向けて極めて重要な知見が得られた

といえる。

#### E. 結論

膀胱上皮内癌における BNCT の Drug delivery system として、高濃度のホウ素ナノデバイスを膀胱内直接投与する方法は、ヒト膀胱癌細胞に対しての高い取り込みと正常膀胱粘膜への晩期有害事象を発生させないことが示唆され、有効性、安全性の観点からきわめて有望である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Clinical effectiveness of boron neutron capture therapy for a recurrent malignant peripheral nerve sheath tumor in the mediastinum. Inoue M, Lee CM, Ono K, **Suzuki M**, Tokunaga T, Sawa Y, Okumura M, J Thorac Oncol. 2010;12:2037-8.
- 2) Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo. SFujii H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, **Suzuki M**, Asano T, Doki Y, Kirihata M, Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM. Radiat Oncol. 2011;20:6-8.
- 3) Ascorbic acid 2-glucoside reduces micronucleus induction in distant splenic T lymphocytes following head irradiation. Kinashi Y, Tanaka H, Masunaga S, Suzuki M, Kashino G, Yong L, Takahashi S, Ono K. Mutat Res. 2010 Jan;695(1-2):69-74.

##### 2. 学会発表

- 1) 京都大学原子炉実験所における加速器 BNCT の治療手順 鈴木 実、田中浩基、櫻井良憲、近藤夏子、劉勇、菓子野元郎、木梨友子、増永慎一郎、岡本賢一、小野公二、丸橋 晃 第7回日本中性子捕捉療法学会学術大会 東京、2010年8月5-6

日

- 2) 京都大学原子炉実験所における加速器 BNCT の治療手順 鈴木 実、田中浩基、櫻井 良憲、劉勇、木梨友子、増永慎一郎、近藤夏子、岡本賢一、丸橋 晃、小野公二 日本放射線腫瘍学会 23 回学術大会 東京、2010年11月18-20日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）  
分担研究報告書

ホウ素ナノデバイス型中性子捕捉治療

研究分担者 丸山一雄 帝京大学薬学部・教授

研究要旨

ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）は細胞選択性に優れた治療法として注目されている。本療法を効果的な治療法として確立していくためには、細胞内ホウ素デリバリー技術が必要となる。この観点から、様々ながん種に高発現しているトランスフェリン（TF）レセプターをターゲットとする TF 修飾 PEG-リボソームは BNCT に適したホウ素デリバリーキャリアであると考えられる。しかしながら、ホウ素化合物である BSH のリボソーム外への漏出が問題として残されていた。この点を解決可能なリボソーム製造法として凍結乾燥法に着目し、使用時に BSH を簡便に封入可能な製剤とした。また、新規ホウ素化合物として BNH を使用して、リボソーム内封率について検討した。

A. 研究目的

ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）は細胞選択性に優れた治療法として注目されている。本療法をより効果的な治療法として確立していくためには、多くのがん細胞にホウ素化合物を送達することが重要である。このような観点から、がん細胞を標的としたホウ素デリバリーキャリアとしてトランスフェリン（TF）修飾 PEG-リボソームの開発を行ってきた。TF 修飾 PEG-リボソームは様々ながん種に過剰発現しているトランスフェリン（TF）レセプターをターゲット可能であることから種々のがんに適応可能な DDS キャリアとして期待される。しかしながら、リボソームに内封したホウ素化合物である BSH が徐々にリボソーム外へ漏出する可能性が問題として残されている。この点を解決可能なリボソーム製造法として凍結乾燥法に着目した。一般に、凍結乾燥法は保存性・復元性に優れていることから、長期保存可能であるのみならず、BSH 溶液を加えるだけでリボソーム内に BSH を封入可能なリボソーム製剤になると考えられる。また、リボソーム内からの漏出を軽減できるホウ素化合物を模索することを目的として新規ホウ素化合物である BNH を利用し、凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リボソーム内への封入率を BSH と比較検討した。

さらに、リボソームからの漏出を防ぐことを目的として、添加剤を用いてホウ素化合物をリボソームに封入する方法を試みた。

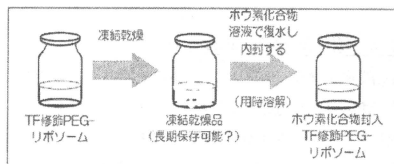


Fig. 1a リボソーム製剤への工夫

長期保存可能で、使用直前にホウ素化合物を内封できると。

B. 研究方法

1. BSH 封入 TF 修飾 PEG-リボソームの調製

1, 2-distearoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine (DSPC) 18.7 mg, Cholesterol 9.2 mg, 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-hydroxysuccinimidylpolyethyleneglycol (DSPE-PEG-NHS) 15.8 mg をエタノール 500  $\mu$ l に溶解させ、80  $^{\circ}$ C に加温した 9% ショ糖溶液 5 ml に加えた。その後、速やかに氷冷し、TF 7.24 mg を加え、室温にて 2 時間放置することでリボソームへの結合を行った。

## 2. リポソームの精製

ポンプの流速を 20 mL/分となるよう調節し、限外ろ過膜 (分子量分画 500 kDa) を用いて discontinuous diafiltration-Sequential Dilution method により TF 修飾 PEG-リポソームを精製した。

## 3. TF 修飾 PEG-リポソームの凍結乾燥製剤化

5mL のバイアル瓶に脂質濃度として 5mg/mL の TF 修飾 PEG-リポソームを 1mL 入れ、液体窒素により凍結した。これを凍結乾燥機に入れ、減圧下で一晩放置することで凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームとした。

## 4. 復水による粒子径変化の検討

凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソーム内への封入物として BSH, BNH, BSH と添加剤 (BSH+Ad), BNH と添加剤 (BNH+Ad), 添加剤を封入してから BSH を封入 (Ad→BSH), 添加剤を封入してから BNH を封入 (Ad→BNH) を用いて、凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームの凍結乾燥前後の粒子径変化を動的光散乱法により測定した。

## 5. ホウ素化合物内封率の検討

凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームに上述のホウ素化合物で復水し、超遠心 (327,000×g, 30 分) を 2 回繰り返してリポソーム外のホウ素化合物を除去した。残ったリポソーム懸濁液に含まれるホウ素濃度を ICP-MS により測定した。

## C. 研究結果

### 1. 凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームの復水による粒子径変化

TF 修飾 PEG-リポソームのがん組織集積メカニズムは、がん組織における血管透過性の亢進を利用したパッシブターゲティングと TF レセプターを介したがん細胞内へのアクティブターゲティングによるものである。それゆえ、効率よくがん組織に移行させるためには正常血管からはリポソームが組織へ移行せず、がん組織では血管から漏出する粒子径 (100~200 nm) にコントロ

ールすることが重要である。そこで、ホウ素化合物で復水することによる凍結乾燥前後の粒子径変化を検討した。

	粒子径 (nm)
凍結前	135.9 ± 65.1
水	145.9 ± 70.8
BSH	157.1 ± 76.9
BNH	163.8 ± 79.6
BSH+Ad	147.1 ± 71.1
BNH+Ad	140.4 ± 61.1
Ad→BSH	158.1 ± 82.3
Ad→BNH	139.5 ± 59.7
	1320.2 ± 263.4

Table.1 凍結乾燥前後の TF 修飾 PEG-リポソームの粒子径変化

その結果、凍結乾燥前と比較して、BSH, BNH, BSH+Ad, BNH+Ad, Ad→BSH では顕著な粒子径変化は認められなかった。また、このときの粒子径はパッシブターゲティングを効率よく誘導可能な 100~200 nm であった。一方、Ad→BNH では一部が 1000 nm を超える粒子径となった。これはリポソームの一部が凝集したことによるものと考えられた。

### 2. ホウ素化合物の TF 修飾 PEG-リポソーム内封率の検討

凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームは、ホウ素化合物の水溶液で復水するだけでリポソーム内にホウ素化合物を封入可能と考えられる。そこで、凍結乾燥 TF 修飾 PEG-リポソームをホウ素化合物溶液で復水することによるホウ素化合物の内封率について検討した。

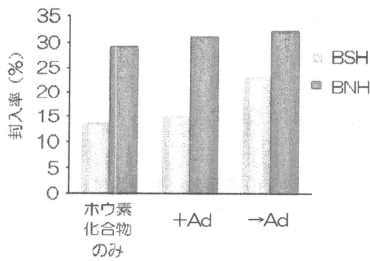


Fig. 2 ホウ素化合物のTF修飾PEG-リポソーム内封率

その結果、ホウ素化合物はBSHよりもBNHが高い封入率を示した。また、添加剤を用いた場合においては、封入率は向上する傾向が認められた。これらのことから、凍結乾燥TF修飾PEG-リポソームは使用時にホウ素化合物溶液で復水するだけで簡便にホウ素化合物を封入可能なリポソーム製剤として期待される。

#### D. 考察

Ad→BNHは最も高い封入率を示したものの、リポソームの凝集が認められたことから、凍結乾燥TF修飾PEG-リポソームの復水方法としては不適であると判断した。次に高い封入率を示したBNH+ Adは、がん組織への集積が期待される粒子径であったことから、凍結乾燥TF修飾PEG-リポソームの復水方法として、適していると考えられる。また、添加剤を用いて高分子化していることから、リポソーム外への漏出を抑制可能と期待される。

今回検討を行ったTF修飾PEG-リポソームの凍結乾燥製剤化と復水によるホウ素化合物封入の技術は、BNCTを目的としたホウ素化合物に適用可能であるのみならず、薬物などの封入にも適用可能と考えられる。したがって、ホウ素化合物と抗がん剤の水溶液で復水することで、がんに対する化学療法とBNCTを同時に実行可能なハイブリッド療法のDDSキャリアにもなり得ると期待される。

#### E. 結論

TF修飾PEG-リポソームの凍結乾燥製剤を開発し、ホウ素化合物で復水するだけで簡便にホウ素化合物を封入可能な製剤とした。ホウ素化合物としてはBNHが高い封入率を示し、添加剤を用いることでリポソーム外への漏出を低減可能と期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

[論文]

1. Liposomal drugs for tumor delivery based on EPR effects, Kazuo Maruyama, *Advanced Drug Delivery Rev.*, 63, 161-169, 2011
2. Circadian Rhythm of Transferrin Receptor 1 Gene Expression Controlled by c-Myc in Colon Cancer-Bearing Mice. Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S. *Cancer Res.* 70 (15), 6238-6246, 2010

[学会発表]

1. Boron Lipid Liposomes: EPR Effect and Fluorescence Imaging. H. Nakamura, N. Ueda, H. S. Banl, K. Maruyama, M. E. El-Zaria. 14<sup>th</sup> International Congress of Neutron Capture Therapy. October 25-29, 2010. Buenos Aires, Argentina.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し



厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）  
分担研究報告書

肝臓腫瘍に対する中性子捕捉療法への DDS の応用

研究分担者 柳衛宏宣 東京大学大学院工学系研究科原子力国際専攻・特任准教授

研究要旨

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、ホウ素化合物を選択的に腫瘍組織に集積させ熱・熱外中性子を照射することにより癌細胞障害効果を生じさせる粒子線治療である。本研究は、中性子捕捉療法を難治性癌である原発性肝臓癌および転移性肝腫瘍に対しての画期的な集学的治療として応用すべく、ボロンデリバリーシステムの研究開発を進めている。

H22年度は、ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソーム (DSPC : DSBL : Cholesterol : PEG-2000 = 2840 : 336 : 1546 : 928 (/mg)、封入ボロン濃度は 3200 ppm) を調整し検討した。リポソームをウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに全身麻酔下に肝動注し肝腫瘍および正常肝組織におけるボロン原子の集積性を ICP-Massspectroscopy を用いて測定した。担癌ウサギにボロン (BSH) 濃度 6.4mg/kg の投与量で投与した場合、投与 72 時間後において、ボロン濃度は腫瘍 : 正常肝組織 : 血液 = 25 : 15 : 10 ppm であった。さらにリポソームを肝動注 48 時間後に京都大学原子炉実験所において全身麻酔下に熱中性子を照射し、PEG Liposome の表面をトランスフェリンで修飾することにより、腫瘍内ボロン濃度を正常肝組織より高めることができ BNCT により腫瘍増殖抑制効果を見いだせた。このリポソーム投与量では BNCT 処置後の正常肝組織の病理的なダメージは認められなかった。

今後、正常肝組織を回避でき、かつ腫瘍選択性のあるターゲティングが期待される。

A. 研究目的

B 型肝炎・C 型肝炎ウイルスの感染に基づく肝硬変により高頻度で発生する原発性肝臓癌や、欧米化による脂質摂取量の増加や食生活の変化に起因する大腸癌の発生および転移は、病期が進み多発性腫瘍形態を呈するものにおいては治療が非常に困難な病態を呈してくる。このため手術療法、化学療法、放射線治療、免疫療法を合わせた集学的治療をいかにオーダーメイド医的に組み合わせることができるかが重要なカギとなってくる。

今回、我々は、新規粒子線治療のひとつである中性子捕捉療法を難治性癌である原発性肝臓癌および転移性肝腫瘍に対しての画期的な集学的治療として応用すべく、より効果的な肝腫瘍に対するボロンデリバリーシステムの研究開発を進めていく。

B. 研究方法

1. ウサギ肝動注モデル

ウサギ肉腫腫瘍 VX-2 を In vitro において培養した。VX-2 細胞をまずウサギ足部に注射後、腫瘍を形成した。その腫瘍を、麻酔下にウサギ肝臓に接種し、2 週間経過観察し、移植肝腫瘍モデルを形成した。

2. ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソーム投与における肝腫瘍への集積性の検討

肝腫瘍への選択的集積性を増強するために、ボロン封入 Stealth Liposome の脂質結合型と内封型を融合させたボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームを調整した。上記 Liposome (脂質結合型 + 内封型) (学習院大学作成) をウサギ VX-2 肝腫

別紙 3

瘍モデルに対して全身麻酔下で肝動注し、投与 24 時間後、48 時間 72 時間、120 時間後における肝腫瘍内・正常肝組織内・血中ボロン濃度および各種臓器内ボロン濃度を ICP-Masspectroscopy を用いて測定した。

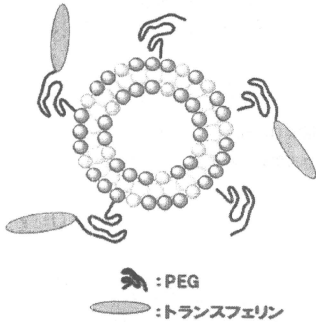


図1. ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームのシェーマ

3. 中性子捕捉療法の治療実験

このように調整した Stealth Liposome を肝動注し、投与 3 日後に、京都大学原子炉において熱中性子  $2 \times 10^{12}$  n/cm<sup>2</sup> を照射し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。

C. 研究結果

1. リポソームの調整

ボロン封入 Stealth Liposome を学殖院大学中村研究室において作成していただき供与を受けた。

① ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型 Stealth Liposome リポソーム組成比は以下のとおりである。

DSPC: DSBL: Cholesterol: PEG=0.9: 1.0: 0.08 (mol ratio)

今回の動注実験のために、DSPC: 2840 mg、DSBL: 336 mg、Cholesterol: 1546 mg、PEG: 928 mg、BSH: 2740 mg、トランスフェリン: 839.68mg (20wt% total lipid)、PEG-NIS: 223.42mg (3mol% lipid) を使用してリポソームを調整した。

このリポソームに封入されたボロン濃度は 3500ppm である。

2. ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームの肝動注を用いた肝臓癌モデルにおける集積性の検討

Stealth Liposome の癌集積性を調べるために、我々が中性子捕捉療法で用いている ICP-Masspectroscopy を用いたボロンの定量法を用いることにした。

ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームの肝動注後の VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルにおける腫瘍および正常肝組織のボロン濃度を測定すると、PEG Liposome の表面をトランスフェリンで修飾することにより、投与 72 時間後に、腫瘍ボロン濃度 25 ppm、正常肝濃度 10~15ppm と腫瘍内ボロン濃度を正常肝組織より高めることができた。また、投与 72 時間までであれば、腫瘍ボロン濃度と正常肝ボロン濃度の濃度比を 2 倍に維持できることがわかった。また、リポソームを肝動注した場合において、肝臓の部位により濃度差は生じておらず、均一に肝動注できていることが分かった。

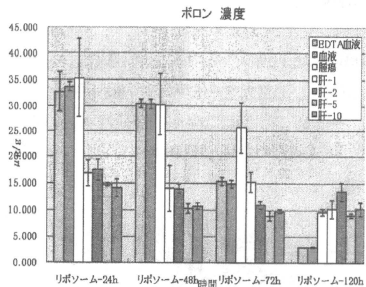


図2 ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームの肝動注後の VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルにおける腫瘍および正常肝組織のボロン濃度 (μg/g)

3. 中性子捕捉療法における腫瘍増殖抑制効果

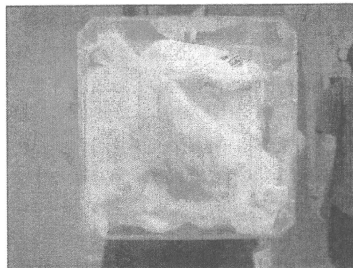


図3 トランスフェリン結合<sup>10</sup>BSH脂質結合および封入PEG LiposomeのVX-2ウサギ肝腫瘍モデルに対する京都大学原子炉実験所における熱中性子照射によるBNCTの照射体位

全身麻酔下に、担癌ウサギを照射用に作成したホルダーに固定し、京都大学原子炉実験所重水照射炉において、熱中性子 $2 \times 10E12$  n/cm<sup>2</sup>を照射した。2週間後にウサギを犠牲死させ、肝腫瘍および腹腔内の状態を観察した。



BNCT治療群(10B-Lip 5ml I.A.)

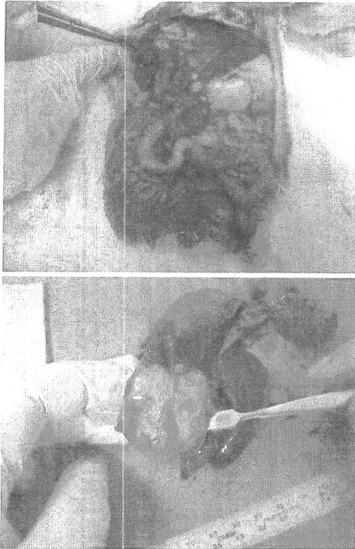
(BNCT治療群は、著明な腫瘍の縮小を認めている)



熱中性子照射コントロール

(熱中性子照射群は、肝右葉および左葉に腫瘍の増殖を認め、癌性腹膜炎の転移性結節を認める)

### 別紙 3



熱中性子非照射コントロール  
(非照射群は、肝右・左葉に腫瘍の増殖を認め、癌性腹膜炎の転移性結節を認める)

#### 図4 中性子捕捉療法における腫瘍増殖抑制効果

上記図4のように、ボロン封入トランスフェリン結合ボロン脂質結合型ステルスリポソームの肝動注後3日後に熱中性子照射を行うと著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。熱中性子のみの照射では腫瘍の増殖抑制は認められず、BNCTの効果を確認できた。さらに、BNCTによる、正常肝組織の壊死などの障害および全身臓器不全は認められなかった。

#### D. 考察

H21年度の実験結果より、PEG Liposomeを用いては網内系の発達している肝臓において腫瘍と正常肝組織のボロン濃度差を増加させるためには、腫瘍選択的な投与などの工夫が必要と思われた。そのためにH22年度は、PEG Liposomeの表面をトランスフェリンで修飾す

ることにより、腫瘍内ボロン濃度を正常肝組織より高めることができた。すなわち投与72時間後に、腫瘍ボロン濃度25ppm、正常肝濃度10~15ppmと腫瘍内ボロン濃度を正常肝組織より高めることができた。また、投与72時間までであれば、腫瘍ボロン濃度と正常肝ボロン濃度の濃度比を2倍に維持できることがわかった。本年度は、熱中性子照射により腫瘍増殖抑制効果も確認できた。このようなインテリジェント化により正常肝組織を回避でき、かつ腫瘍選択性のあるターゲティングが期待される。

#### E. 結論

ホウ素ナノデバイス製剤の肝癌がんへの適応検討というテーマで、H21年度においてはウサギの肝腫瘍モデルをさらに作成し、H22年度にPEG Liposomeの表面をトランスフェリンで修飾することにより、腫瘍内ボロン濃度を正常肝組織より高めることができ京都大学原子炉実験所にて熱中性子を照射後、BNCTにより腫瘍増殖抑制効果を見いだせた。

今後、さらに、インテリジェントな腫瘍選択性のあるターゲティングが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

- 1) Feasible Evaluation of Neutron Capture Therapy for Hepatocellular Carcinoma using Selective Enhancement of Boron Accumulation in Tumour with Intra-arterial Administration of Boron-Entrapped Water-in-Oil-in-Water Emulsion. Hironobu Yanagie, Hiroaki Kumada, Takemi Nakamura, Syushi Higashi, Ichiro Ikushima, Yasuyuki Morishita, Atsuko Shinohara, Fujiwara Mitsuteru, Minoru Suzuki, Hirota Sugiya, Tetsuya Kajiyama, Ryohei Nishimura, Koji Ono, Masazumi Eriguchi, and Hiroyuki Takahashi, Proceedings of 14th

別紙 3

International Congress of Neutron Capture Therapy,  
pp 157-160, 2010

2) 中性子捕捉療法におけるドラッグデリバリーシステムの応用. 柳衛宏宣、高橋浩之, 日本 AEM 学会誌, 18(1), 12-20, 2010 中性子捕捉療法におけるドラッグデリバリーシステムの応用. 柳衛宏宣、高橋浩之, 日本 AEM 学会誌, 18(1), 12-20, 2010

学会発表

1) Feasible Evaluation of Neutron Capture Therapy for Hepatocellular Carcinoma using Selective Enhancement of Boron Accumulation in Tumour with Intra-arterial Administration of Boron-Entrapped Water-in-Oil-in-Water Emulsion. : Hironobu Yanagie, Hiroaki Kumada, Takemi Nakamura, Syushi Higashi, Ichiro Ikushima, Yasuyuki Morishita, Atsuko Shinohara, Mitsuteru Fujiwara, Minoru Suzuki, Yoshinori Sakurai, Hirota Sugiya, Tetsuya Kajiyama, Ryohei Nishimura, Koji Ono, Nakajima Jun, Ono Minoru, Masazumi Eriguchi, and Hiroyuki Takahashi , 14 International Congress of Neutron Capture Therapy, 25<sup>th</sup> October 2010, Buenosaires, ARZENTINE

2) 肝臓癌に対する中性子捕捉療法への応用に向けたリポソーム・ボロンデリバリーシステムの肝臓腫瘍への集積性と問題点: 柳衛宏宣、鈴木 実、櫻井良憲、猪俣 童、柳川将志、飯塚智也、櫻井由里子、毛利さくえ、篠原厚子、水町涼治、村田雄二、潘 鉉承、伊豫本直子、横山和仁、西村亮平、中村浩之、小野公二、小野 稔、高橋浩之、第 7 回日本中性子捕捉療法学会、2010 年 8 月 5 日、学習院大学、東京

3) 肝臓癌に対する中性子捕捉療法への応用に向けたリポソーム・ボロンデリバリーシステムの基礎的検討: 柳衛宏宣、鈴木 実、櫻井良憲、猪俣 童、櫻井由里子、毛利さくえ、篠原厚子、水町涼治、村田雄二、

潘 鉉承、伊豫本直子、横山和仁、中村浩之、小野公二、中島 淳、小野 稔、江里口正純、高橋浩之、第 7 回東京大学医学部付属病院医工連携部発表会、2011 年 2 月 2 日、東京

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

## 1. 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
K. Maruyama	Application of transferrin-liposomes for intracellular drug delivery	Y. Park, J. Liang, J. Balthasar, V. Yang	Drug Delivery Systems for Targeted Drug Therapy	American Association of Pharmaceutical Science	Washington D.C	2011	印刷中
H. Nakamura	Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy of Cancer	N. S. Hosman	Boron Science: New Technologies and Applications	CRC Press	Danvers	2011	163-177

## 2. 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
H. S. Ban, Y. Uto, H. Nakamura	Hypoxia-Inducible Factor Inhibitors: A Survey of Recent Patented Compounds (2004-2010)	Expert Opinion on Therapeutic Patents	21(2)	131-146	2011
中村浩之	ホウ素の中性子捕捉反応を利用した低侵襲細胞選択的放射線療法	Yakugaku Zasshi	130	1687-1694	2010
上野学、潘鉉承、中村浩之	リポソームを用いる中性子捕捉治療	Drug Delivery System	25(5)	474-482	2010
A. R. Genady, H. Nakamura	Undecahydro-closo-dodecaborates as good leaving groups in organic synthesis: Generation of substituted styrenes via elimination of arylethyl dodecaborates	Org. Biomol. Chem.	8	4427-4435	2010
中村浩之	中性子捕捉治療のためのナノカプセル型ホウ素薬剤送達システム (BDS) の開発	Pharm. Tech. Japan (invited)	26	1005-1012	2010
M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, Y. Kaneda, A. Matsumura, H. Nakamura	closo-Dodecaborate Lipid Liposomes as New Boron Delivery Vehicles for Neutron Capture Therapy of Cancers	Bioorg. Med. Chem.	18	3059-3065	2010

## 別紙 4

Komoda H, Okura H, Lee CM, Sugawara N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto A, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A	Reduction of Neu5GC Xenoantigen on human ADSC/MSCs lead to them as a safer and more useful cell sources for realizing various stem cell therapies	Tissue Engineering Part A	16(4)	1143-1155	2010
Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y	Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model	Tissue Engineering Part C Methods	16(3)	417-425	2010
Okura H, Komoda H, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Hamada Y, Fumimoto Y, Lee CM, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A	Properties of Hepatocyte-like Cell Clusters Derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	Tissue Engineering Part C Methods	16(4)	761-770	2010
Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Osaki T, Lee CM, Mizuguchi H, Takahashi T, Ripley B, Okumura M, Kawase I, Kishimoto T, Naka T	Overexpression of SOCS3 exhibits preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma	Int J Cancer		印刷中	2011
Fujii H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kirihata M, Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM	Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo	Radiat Oncol	6	8(1-12)	2011
Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A	Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduced serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits	Tissue Engineering Part C Methods	17(2)	145-154	2011
Inoue M, Lee CM, Ono K, Suzuki M, Tokunaga T, Sawa Y, Okumura M	Clinical effectiveness of boron neutron capture therapy for a recurrent malignant peripheral nerve sheath tumor in the mediastinum	J Thorac Oncol	5(12)	2037-2038	2010
Kinashi Y, Tanaka H, Masunaga S, Suzuki M, Kashino G, Yong L, Takahashi S, Ono K	Ascorbic acid 2-glucoside reduces micronucleus induction in distant splenic T lymphocytes following head irradiation	Mutat Res	695(1-2)	69-74	2010
Kazuo Maruyama	Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects	Advanced Drug Delivery Rev.	63	161-169	2011
Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S	Circadian Rhythm of Transferrin Receptor 1 Gene Expression Controlled by c-Myc in Colon Cancer-Bearing Mice	Cancer Res.	70(15)	6238-6246	2010

## 別紙 4

Endo K, Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Shibata Y, Matsumura A.	JRR-4 facility for animal irradiation experiments, therapy	Proceedings of 14th International Congress of Neutron Capture Therapy		427-429	2010
Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Yoshida F, Tsurubuchi T, Matsuda M, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Matsumura A.	Development of a functional liposome modified a novel lipid analog for BNCT	Proceedings of 14th International Congress of Neutron Capture Therapy		335-338	2010
Yoshida F, Nakai K, Isoe T, Inomata R, Zaboronok A, Yamamoto Y, Shirakawa M, Yamamoto T, Matsumura A, Nakamura H.	Biodistribution of BS H-encapsulated boron liposome in mouse glioma	Proceedings of 14th International Congress of Neutron Capture Therapy		339-340	2010
Hironobu Yanagie, Hiroaki Kumada, Takemi Nakamura, Syushi Higashi, Ichiro Ikushima, Yasuyuki Morishita, Atsuko Shinohara, Fiiwara Mitsuteru, Minoru Suzuki, Hirotaka Sugiyama, Tetsuya Kajiyama, Ryohei Nishimura, Koji Ono, Masazumi Eriguchi, and Hiroyuki Takahashi	Feasible Evaluation of Neutron Capture Therapy for Hepatocellular Carcinoma using Selective Enhancement of Boron Accumulation in Tumour with Intra-arterial Administration of Boron-Entrapped Water-in-Oil-in-Water Emulsion	Proceedings of 14th International Congress of Neutron Capture Therapy		157-160	2010
柳衛宏宣、高橋浩之	中性子捕捉療法におけるドラッグデリバリーシステムの応用	日本AEM学会誌	18(1)	12-20	2010



## 研究成果の刊行物・別刷

# 8 Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy of Cancer

Hiroyuki Nakamura

## CONTENTS

8.1	Introduction .....	163
8.2	Boron Compound-Encapsulated Liposome Approach .....	164
8.2.1	Carcinoembryonic Antigen-Targeted Liposomes .....	164
8.2.2	Various Boron Compounds-Encapsulated PEG Liposomes .....	164
8.2.3	Folate Receptor-Targeted Liposomes .....	165
8.2.4	Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Liposomes .....	166
8.2.5	Transferrin Receptor-Targeted Liposomes .....	166
8.3	Boron Lipid-Liposome Approach .....	167
8.3.1	<i>nido</i> -Carborane Amphiphile .....	167
8.3.2	<i>nido</i> -Carborane Lipids .....	168
8.3.3	<i>closo</i> -Dodecaborate Lipids .....	170
8.4	Boron Cholesterol-Liposome Approach .....	174
8.5	Summary .....	175
	References .....	175

## 8.1 INTRODUCTION

The high accumulation and selective delivery of  $^{10}\text{B}$  into the tumor tissue are the most important requirements to achieve efficient boron neutron capture therapy for cancer (BNCT), because the cell-killing effect of BNCT depends on the nuclear reaction of two essentially nontoxic species, boron-10 ( $^{10}\text{B}$ ) and thermal neutrons, whose destructive effect is well documented in boron-loaded tissues (Barth, 2003; Barth, 2009; Hawthorne, 1993; Soloway et al., 1998). Two boron compounds, sodium mercaptoundecahydrododecaborate ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ ;  $^{10}\text{BSH}$ ) (Soloway et al., 1967) and L-*p*-boronophenylalanine (L- $^{10}\text{BPA}$ ) (Snyder et al., 1958), have been clinically utilized for the treatment of patients with malignant brain tumors (Nakagawa et al., 1997) and malignant melanoma (Mishima et al., 1989). According to the theoretical estimations as well as clinical data, three important parameters should be considered in the development of boron carriers for fatally damaging tumor cells with BNCT: (1) boron concentrations in the tumor should be in the range of 20–35  $\mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ ; (2) the tumor/normal tissue ratio should be greater than 3; and (3) the toxicity should be sufficiently low (Barth, R. F. et al., 2005). Recently, BNCT has been applied to various cancers, including head and neck cancer (Aihara et al., 2006; Kato et al., 2004), lung cancer, hepatoma (Suzuki et al., 2007), chest wall cancer, and mesothelioma (Ono et al., unpublished). Therefore, the development of new boron carriers is one of the most important issues that should be resolved to extend the application of BNCT to various cancers.

In the last decade, boron carrier development has taken two directions: small boron molecules and boron-conjugated biological vehicles. Unlike approaches using pharmaceuticals, boron carriers

require high-tumor selectivity and should be essentially nontoxic. Therefore, the approach to use biological vehicles has become one of the recent trends to accumulate a large amount of  $^{10}\text{B}$  in tumor tissues.

**Q2** Liposomes, whose size typically ranges in mean diameters from 50 to 200 nm, display some unique pharmacokinetic characteristics. Liposomes exhibit preferential extravasation and accumulation at the site of solid tumors due to increased endothelial permeability and reduced lymphatic drainage in these tissues, which has been defined as enhanced permeability and retention effect (Matsumura et al., 1986; Maeda et al., 2000). Therefore, liposomes are efficient drug-delivery vehicles, because encapsulated drugs can be delivered to tumor selectively. Liposomal boron delivery system (BDS), in this context, is also considered to be promising for BNCT due to the possibility of carrying a large amount of  $^{10}\text{B}$  compound. Two approaches have been investigated for the use of liposomes as boron-delivery vehicles: (1) encapsulation of boron compounds into liposomes, and (2) incorporation of boron-conjugated lipids into the liposomal bilayer. In this chapter, new technologies for liposomal BDS using both boron-encapsulation and boron-lipid liposome approaches are described.

## 8.2 BORON COMPOUND-ENCAPSULATED LIPOSOME APPROACH

### 8.2.1 CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN-TARGETED LIPOSOMES

Yanagie and coworkers first investigated a BSH-encapsulated liposome which was conjugated with a monoclonal antibody specific for carcinoembryonic antigen (CEA) (Yanagie et al., 1989, 1991). They prepared a new murine monoclonal antibody (2C-8) by injecting mice *i.p.* with CEA producing human pancreatic cancer cell line, AsPC-1. This anti-CEA monoclonal antibody was conjugated with large multilamellar liposomes incorporated  $\text{Cs}_2^{10}\text{BSH}$ . The liposome was prepared from egg yolk phosphatidylcholine, cholesterol, and dipalmitoylphosphatidylethanolamine (1/1/0.05), and  $\text{Cs}_2^{10}\text{BSH}$  was encapsulated. The liposomes were treated with dithiothreitol and suspended in the *N*-hydroxysuccinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate-treated antibody solution for conjugation. This immunoliposome was shown to bind selectively to human pancreatic carcinoma cells (AsPC-1) bearing CEA on their surface. The therapeutic effects of locally injected BSH-encapsulated immunoliposome on AsPC-1 xenografts in nude mice were evaluated. After intratumoral injection of the immunoliposomes, boron concentrations in tumor tissue and blood were  $49.6 \pm 6.6$  and  $0.30 \pm 0.08$  ppm, respectively. Thermal neutron irradiation ( $2 \times 10^{12}$  n/cm<sup>2</sup>) suppressed tumor growth in mice with intratumoral injection of BSH-encapsulated immunoliposomes and hyalinization and necrosis were found in the immunoliposome-treated tumors (Yanagie et al., 1997).

### 8.2.2 VARIOUS BORON COMPOUNDS-ENCAPSULATED PEG LIPOSOMES

Hawthorne and coworkers reported the preparation of boron-encapsulated liposomes from distearoylphosphatidylcholine (DSPC) and cholesterol. They encapsulated the hydrolytically stable borane anions  $\text{B}_{10}\text{H}_{10}^{2-}$ ,  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}^{2-}$ ,  $\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{OH}^{4-}$ ,  $\text{B}_{20}\text{H}_{19}^{3-}$ , and the normal form and photoisomer of  $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$  in liposomes as their water-soluble sodium salts. Selective boron accumulation in tumor was observed in the use of these liposomes, although the boron compounds used do not normally exhibit affinity for tumors and are normally rapidly cleared from the body. The highest tumor concentrations achieved the therapeutic range ( $>15$   $\mu\text{g}$  of boron per gram of tumor), but more favorable results were obtained with the two isomers of  $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$ . These boron compounds have the capability to react with intracellular components after they have been deposited within tumor cells by the liposome, thereby preventing the borane ion from being released into blood (Shelly et al., 1992). The PEG-conjugated liposome was prepared with 5% PEG-200-distearoyl phosphatidylethanolamine and an apical-equatorial (*ae*) isomer of the  $\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3^{3-}$  ion,  $[1-(2'-\text{B}_{10}\text{H}_9)-2-\text{NH}_3\text{B}_{10}\text{H}_8]^{3-}$ , was encapsulated into the liposome. This liposome exhibited a long circulation lifetime due to escape from the

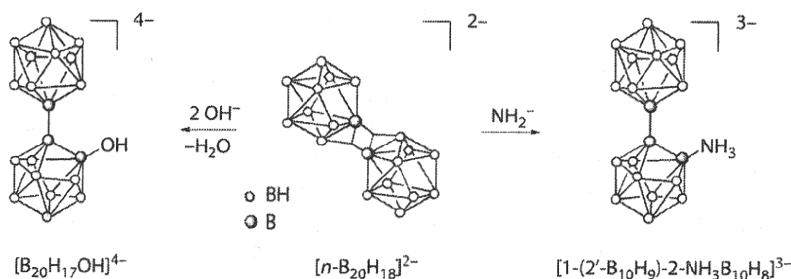


FIGURE 8.1 Hydrolysis and amination of  $n-B_{20}H_{18}^{2-}$ .

reticuloendothelial system (RES), resulting in the continued accumulation of boron in the tumor over the entire 48 h experiment and reaching a maximum of 47  $\mu\text{g}$  of boron per gram of tumor (Feakes et al., 1994). Preparation of  $B_{20}H_{17}OH^{4-}$  and  $[1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_8]^{3-}$  from  $n-B_{20}H_{18}^{2-}$  is shown in Figure 8.1.

### 8.2.3 FOLATE RECEPTOR-TARGETED LIPOSOMES

Expression of folate receptor (FR) frequently is amplified among human tumors. Lee and coworkers developed boron-containing folate receptor-targeted liposomes (Pan, X. Q. et al., 2002). Two negatively charged boron compounds,  $Na_2[B_{12}H_{11}SH]$  and  $Na_3[B_{20}H_{17}NH_3]$ , as well as five weakly basic boronated polyamines, SPD-5, SPM-5, ASPD-5, ASPM-5, and SPM-5,10, as shown in Figure 8.2, were incorporated into liposomes by a pH-gradient-driven remote-loading method with varying loading efficiencies. Greater loading efficiencies were obtained with lower molecular weight boron derivatives, using ammonium sulfate as the trapping agent, compared to those obtained with sodium citrate. The *in vitro* boron uptake of folate-conjugated liposomes was investigated using human KB squamous epithelial cancer cells. Higher cellular boron uptake (up to 1584  $\mu\text{g}/10^9$  cells) was observed with FR-targeted liposomes than with nontargeted control liposomes (up to 154  $\mu\text{g}/10^9$  cells).

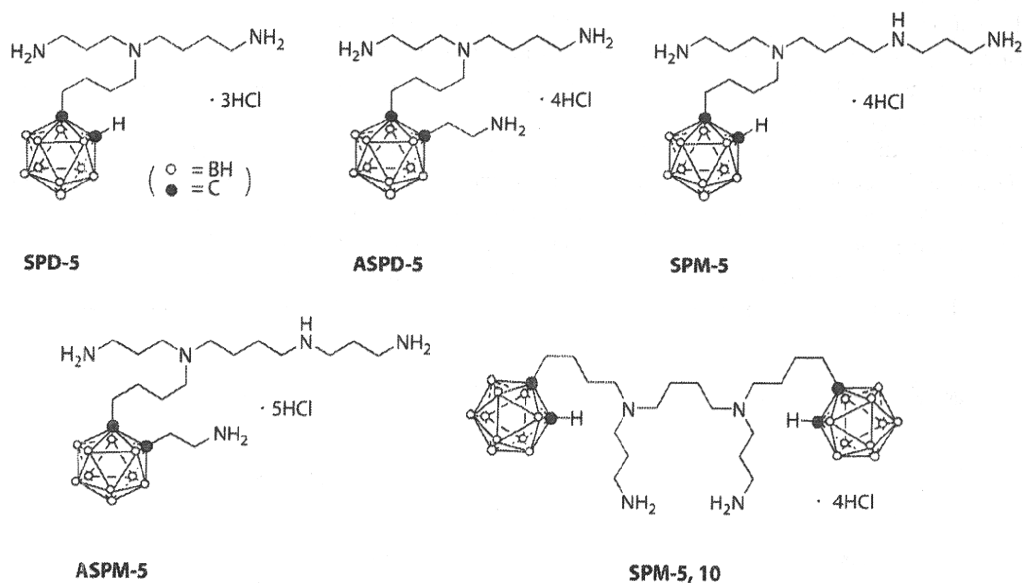


FIGURE 8.2 Structures of boronated polyamine derivatives.