

201011026B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

「RNA創薬を支援するバイオイメージング技術の確立」に関する研究

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 浅井 知浩

平成23（2011）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
「RNA創薬を支援するバイオイメージング技術の確立」に関する研究	浅井 知浩
	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 12
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 15

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総合研究報告書

RNA創薬を支援するバイオイメージング技術の確立（H20-ナノ-若手-007）

主任研究者 浅井 知浩 静岡県立大学大学院薬学研究科講師

研究要旨 本研究では small interfering RNA (siRNA) の体内動態を非侵襲的、リアルタイムかつ高感度に解析する技術の確立を目的とし、siRNA の ^{18}F ポジトロン標識体の開発ならびにポジトロン断層法 (positron emission tomography; PET) による動態解析技術の構築を目指した。はじめに、Non-RI 条件下にてフッ素標識 siRNA の合成を検討した。アンチセンス鎖 3' 末端にスペーサーとアミノ基を導入した siRNA を原料とし、*N*-succinimidyl 4-fluorobenzoate (SFB) を反応させた。反応物を HPLC にて分離後、ESI-TOF-MS によって同定し、目的化合物を得たことを確認した。次に同条件で *N*-succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate (S^{18}FB) を用いて ^{18}F ポジトロン標識 siRNA を合成し、反応中に分解を受けていないことを確認した。 ^{18}F 標識 siRNA をマウスに尾静脈内に設置したカニューレより投与し、その体内動態を簡易型二次元 PET 装置 (planar positron imaging system: PPIS) を用いて解析した。PET スキャン終了後には各臓器を摘出し、組織中の放射活性をガンマカウンターで測定した。その結果、siRNA 単体では投与後速やかに腎臓に集積し、膀胱に移行する様子が観察された。

化学修飾 siRNA の体内動態の PET 解析を試みた。センス鎖 3' 末端にコレステロールを結合した siRNA のアンチセンス鎖 3' 末端を ^{18}F 標識し、マウスにおける体内動態を解析した。コレステロール結合 siRNA は、naked siRNA と比較して血中半減期が延長した。また、コレステロール結合 siRNA は、naked siRNA と比較して肝臓に高い集積性を示した。このように化学修飾による siRNA 動態制御の有効性を PET イメージングすることに成功した。

ナノパーティクルを siRNA ベクターとして用い、マウスにおける siRNA の体内動態を解析した。ナノパーティクルとしてはカチオニックリポソームとポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームを用いた。PET 解析の結果、カチオニックリポソームに搭載した siRNA は、尾静脈内投与後速やかに肺に集積し、肺に留まる様子が観察された。一方で、PEG 修飾リポソームに搭載した siRNA では、全身から強いシグナルが検出され、PEG 修飾リポソームの特徴である長期血中滞留性を示すデータが得られた。カチオニックリポソームとの比較では、肺に捕捉されない分、肝臓や脾臓への分布が検出された。以上のように、用いたベクターの性質に依存して siRNA の動態が変化する様子を非侵襲的にイメージングすることに成功した。

疾患モデル動物における siRNA 体内動態の PET 解析を実施した。Colon26 NL-17 大腸がん細胞をマウス右後肢皮下に移植し、担がんマウスを作成した。カチオニックリポソーム、PEG 修飾リポソーム、あるいは PEG の先端に VEGFR1 親和性ペプチドを結合したリガンド結合型リポソームに ^{18}F 標識 siRNA を搭載し、担がんマウスにおける体内動態を PET 解析した。その結果、PEG 修飾リポソームあるいはリガンド結合型リポソームに搭載した siRNA におい

て高い腫瘍集積性が観察された。

以上のように、本研究にて開発した siRNA 体内動態の PET 解析法は、新規ベクターの有用性の評価、疾患部位への siRNA 集積量の評価に応用可能であることが示された。本研究事業によって得られた成果により、RNA 創薬における siRNA 体内動態の PET 解析技術の有用性が証明された。本技術によって医薬品候補の siRNA の体内動態に関して有益な情報が得られることにより、RNA 創薬の開発効率を高め、創薬の加速化に結び付くことが期待される。

A. 研究目的

次世代の医薬品として有力な small interfering RNA (siRNA) の医療応用を促進するには、疾患部位に必要な量の siRNA を送達可能な全身投与型デリバリーシステムの開発が必要である。これまで siRNA の運搬体 (リポソーム、高分子ミセル等のベクター) の体内動態は詳細に解析されてきたが、主薬である siRNA 本体の体内動態は未知のことが多い。そこで本研究では siRNA の体内動態を非侵襲的、リアルタイムかつ高感度に解析する技術の確立を目的とし、siRNA の ^{18}F ポジトロン標識体の開発ならびにポジトロン断層法 (positron emission tomography; PET) による動態解析技術の構築を目指した。本研究の特徴は、1) 他の類似技術よりも比較的高感度なイメージング技術であること、2) ベクターではなく主薬である siRNA の動態解析技術であること、3) 疾患、標的配列、ベクターによって限定されず応用範囲が広いこと、4) ヒトマイクロドーズ試験への発展性などが挙げられる。

本研究の目標達成によって siRNA の体内動態データが取得可能となれば、治療効果を予測するうえでも DDS 医薬品の製剤設計にフィードバックするうえでも貴重な情報が得られることになり、動物を利用したヒトでの有効性・問題点評価に有効であると考えられる。さらに PET は、がん検診でヒトでの使用実績があるうえ、マイクロドーズ試験への応用が研究されており、siRNA の PET による動態解析は先見性の高い試みといえる。短半減期のポジトロンを使用する PET 解析は、長時間の動態解析には向かないが、被ばくの観点か

らはヒトへの応用に向けた動態解析技術といえる。3ヶ年計画の研究事業の具体的な検討項目は、siRNA ポジトロン標識体の開発、siRNA 体内動態の PET 解析技術の確立、蛍光 *in vivo* イメージングとの比較、各種ベクターに搭載した標識 siRNA の動態解析、病態モデル動物における siRNA の動態解析である。

B. 研究方法

(1) siRNA ポジトロン標識体の開発

アンチセンス鎖 3'末端に 6 炭素スペーサーおよびアミノ基を導入した前駆体 siRNA を北海道システム・サイエンス社に委託して合成した。siRNA の配列は、スクランブル (コントロール) 配列を用いた。このアミノ化 siRNA と [^{18}F]-コハク酸イミド誘導体をホウ素緩衝液中で混合し、室温にて 20 分間静置して反応させた。次に限外濾過操作によって未反応の ^{18}F を除去し、ポジトロン標識 siRNA (^{18}F 標識 siRNA) を得た。なお、 ^{18}F を取り扱う実験は、浜松ホトニクス株式会社中央研究所 PET センターの研究協力を得て実施した。

(2) siRNA 分析法の検討

siRNA のセンス鎖、アンチセンス鎖、およびアニーリング後の 2 本鎖をそれぞれ検出可能な LC/ESI-TOF-MS の分析条件を検討した。まず、コールド (非放射性) の化合物を用いて分析法を確立し、その条件をポジトロン標識 siRNA の分析に応用した。HPLC のカラムには C18 ODS を使い、移動相は TEAA とアセトニトリルとのグラジエント条件とした。ESI-TOF-MS 計測時のイオン化では、ネガティブイオン化モードを選択した。

(3) リポソーム化 siRNA の調製

カチオン性脂質 DOTAP とコレステロールをトブタノール溶液中で混合し、一晚凍結乾燥した。RNase フリーのリン酸緩衝液で水和後、リポソームの粒子径をエクストルージョン法にて約 100 nm に調整した。¹⁸F-siRNA とリポソームを室温にて 20 分間インキュベートし、リポソーム化 siRNA を調製した (カチオニックリポソーム)。また、リポソーム化 siRNA 溶液に MPEG6000-DSPE を加え、60°C で 10 分間インキュベートして PEG 修飾を施した (PEG 修飾リポソーム)。各リポソーム化 siRNA の粒子径および電位は、Zetasizer Nano ZS を用いて計測した。

(4) リポソーム化 siRNA の安定性

siRNA 溶液あるいはリポソーム化 siRNA 溶液に最終濃度 90% 血清となるように血清を混和し、37°C にて 1 時間インキュベートした。siRNA を抽出した後、ポリアクリルアミド電気泳動によって分離し、Ethidium Bromide により染色した。各バンドの蛍光強度は、LAS-3000 を用いて測定した。

(5) siRNA 体内動態の PET 解析

¹⁸F-siRNA 単体ならびに上述のリポソームに搭載した ¹⁸F-siRNA の体内動態を解析した。5 週齢雄性 BALB/c マウスに各サンプルを尾静脈内に設置したカニューレより投与し、簡易型 2 次元 PET 装置 (planer positron imaging system) を用いて体内動態を解析した。1 時間の PET 計測終了後にマウスを解剖し、各臓器における放射活性をガンマカウンターにて測定した。

(6) 蛍光標識 siRNA の *in vivo* イメージング

近赤外蛍光色素である Alexa750 で標識した siRNA を用いて、siRNA 搭載リポソームを調製した。蛍光 *in vivo* イメージングの装置としては、Xenogen 社の IVIS[®] Lumina を用いた。5 週齢雄性 BALB/c マウスに尾静脈内投与し、投与直後より経時的に siRNA の体内動態を観察した。1 時間のイメージング終了後にマウスを解剖し、各臓器における蛍光強度を *ex vivo* にて評価した。

(7) 化学修飾 siRNA の PET 動態解析

化学修飾 siRNA としては、コレステロール結合 siRNA を用いた。コレステロールの結合箇所は、ポジロン標識箇所のアンチセンス鎖 3'末端とは反対側のセンス鎖 3'末端にし、siRNA の活性に影響を及ぼさない箇所を選択した。加えて、反応効率に影響を与えにくい設計にした。コレステロール結合 siRNA のポジロン標識は、上述の naked siRNA の標識と同様の方法で実施した。¹⁸F 標識コレステロール結合 siRNA および対照の ¹⁸F 標識 siRNA をマウスに尾静脈内投与し、PET を用いて体内動態解析を行った。

(8) 新規ベクターに搭載した siRNA の PET 動態解析

siRNA ベクターとして新規に開発したポリカチオン脂質 (dicetylphosphate-tetraethylenepentamine: DCP-TEPA) を主成分とするリポソーム (TEPA リポソーム) を調製した。コレステロール結合 siRNA を TEPA リポソームに搭載することにより、静電的相互作用および疎水性相互作用によって安定的に形成されるナノ粒子を開発した。そこで、¹⁸F 標識コレステロール結合 siRNA を用い、TEPA リポソームに搭載した siRNA の体内動態の PET 解析を試みた。粒子径約 100 nm の TEPA リポソームを調製後、¹⁸F 標識コレステロール結合 siRNA を添加し、20 分間インキュベーションすることでナノ粒子を形成させた。その後、ポストインサクション法によって PEG5000-DSPE をナノ粒子に修飾した。これら複合体の PET 解析を実施した。

(9) 疾病モデル動物を用いた siRNA 動態解析

Colon26-NL17 細胞株 (マウス大腸がん細胞株) をマウス右足皮下に移植し、疾病モデル動物として固形がん担がんマウスを作成した。siRNA ベクターとしては DOTAP を主成分とするカチオニックリポソーム、同リポソームに PEG6000 を修飾した PEG リポソーム、および腫瘍新生血管内皮細胞に親和性の高い標的リガンド (Ala-Pro-Arg-Pro-Gly : APRPG) を PEG6000 の先

端に提示する APRPG リボソームを検討に用いた。各種リボソームベクターに搭載した ^{18}F 標識 siRNA をマウス尾静脈内より投与し、その体内動態を PET 解析した。

・倫理面への配慮

当該研究に関して、すべての動物実験プロトコールは、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、動物愛護の精神にのっとり、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て用いた。

C. 研究結果

(1) siRNA ポジトロン標識体の開発

siRNA を非放射性的 F で標識し、HPLC 分析を行った結果、標識 siRNA と未反応の siRNA の 2 本のピークが得られた。標識 siRNA のピークを LC で分離し、ESI-TOF-MS を用いて分析した。その結果、F 標識 siRNA に該当する多価イオンのピークが得られた (図 1)。同様の条件にてポジトロン標識 siRNA を分析し、 ^{18}F 標識 siRNA の分解に成功した。 ^{18}F 標識 siRNA が合成中に分解を受けていないことを電気泳動にて確認し、インビゴ解析への応用が可能であることを明らかにした。

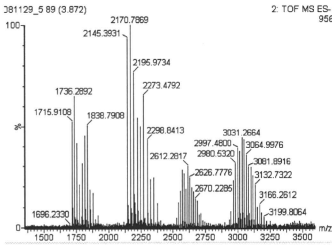


図 1 F 標識 siRNA の LC/ESI-TOF-MS データ

(2) siRNA 体内動態の PET 解析

はじめに siRNA の血清中での安定性について *in vitro* で検討した結果、siRNA 単体では血清中で速

やかに分解されるが、リボソームベクターに搭載した siRNA は血清中で安定に存在しうることが明らかとなった。次に、 ^{18}F -siRNA 単体ならびにリボソームに搭載した ^{18}F -siRNA のマウスにおける体内動態を PET 解析し、その結果を図 2 に示した。siRNA 単体では投与後速やかに腎臓に集積し、膀胱に移行する様子が観察された。カチオン性リボソームに搭載した siRNA は投与後速やかに肺に集積し、そのまま肺に留まる様子が観察された。さらに、PEG 修飾リボソームに搭載した siRNA では、PET 計測終了時の 1 時間後においても全身からシグナルが検出され、PEG 修飾リボソームの特徴である長期血中滞留性を反映したイメージデータが得られた。また、カチオン性リボソームとの比較では、初回通過臓器である肺に捕捉されない分、肝臓や脾臓等への分布が検出された。PET 解析後に各臓器における放射活性を測定した結果、 ^{18}F の臓器分布はイメージデータと一致しており、両データ間の整合性が確認された。

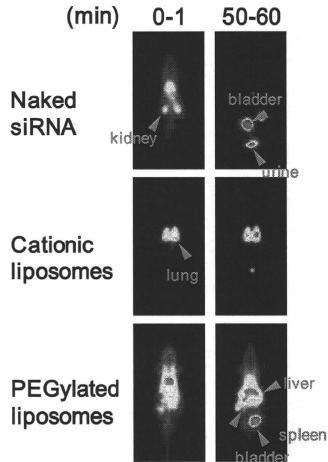


図 2 ^{18}F 標識 siRNA を用いた PET イメージデータ

(3) 近赤外蛍光イメージング法との比較

Alexa750 標識 siRNA をマウスに尾静脈内投与し、IVIS® Lumina を用いてその体内動態を解析した。標識および測定装置を除き、PET 解析とまったく同様の条件で実験を行った。その結果、PET 解析法とは異なり、蛍光法では体表面に近い臓器からのシグナルが強調された (図 3)。蛍光法では体表面からの深度の影響が大きいため、非侵襲的なリアルタイムイメージングと解剖後の *ex vivo* データに差が生じた。*in vivo* イメージングでは、体表面に近い膀胱のシグナルが過度に強調され、その他の臓器分布のシグナルは相対的に減弱していた。PET イメージングで確認された PEG 修飾リポソームの長期血中滞留性は、近赤外蛍光の *in vivo* イメージングでは捉えることができなかった。しかしながら、蛍光法においても解剖後の *ex vivo* データは、PET イメージングデータおよび PET 解析後の臓器分布データとほぼ一致していた。

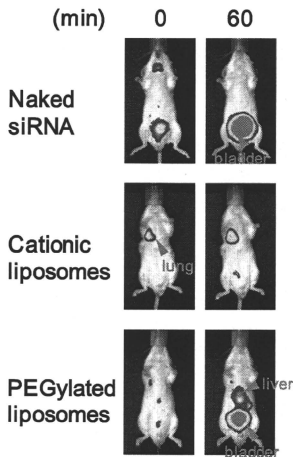


図 3 Alexa750 標識 siRNA を用いた近赤外蛍光イメージングデータ

(4) 化学修飾 siRNA の PET 動態解析

^{18}F 標識コレステロール結合 siRNA を合成したところ、PET 解析にあたって十分な放射活性を有する目的化合物が得られた。そこで ^{18}F 標識コレステロール結合 siRNA および ^{18}F 標識 naked siRNA をマウスに尾静脈内投与し、それぞれの体内動態を比較した。naked siRNA 単独では、大部分が投与直後に腎臓に集積し、続いて速やかに膀胱に移行した。一方、コレステロール結合 siRNA は一部膀胱に集積したものの、肝臓にも集積性を示した (図 4)。また、naked siRNA と比較して全身からのシグナルが高く、血中滞留性が高いことが示された。1 時間の PET イメージング終了後、動物を解剖して各臓器の放射活性をガンマカウンターによって測定した結果、コレステロール結合 siRNA は naked siRNA に比べ、肝臓では約 5 倍、血液では約 10 倍高い値を示した。 ^{18}F の臓器分布はイメージングデータと一致しており、実験の整合性が確認された。

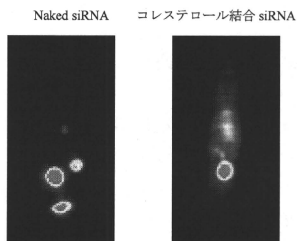


図 4 ^{18}F 標識コレステロール結合 siRNA の PET イメージングデータ

(5) 新規ベクターに搭載した siRNA の PET 動態解析

naked siRNA を搭載した新規ベクターでは大部分の siRNA が膀胱に移行している様子が観察さ

れた。この挙動は naked siRNA を投与した動態と酷似しており、複合体から乖離した siRNA が速やかに排泄されたと考えられる。一方、コレステロール結合 siRNA を用いた複合体では、全身からの強いシグナルが観察され、高い血中滞留性を示した。また複合体の一部が肝臓や脾臓などの細網内皮系組織に捕捉される様子が観察された。以上のコレステロール結合 siRNA の挙動は、新規ベクターの体内動態試験結果とほぼ一致しており、*in vivo* において siRNA が新規ベクターにしっかりと保持され、体内動態制御がなされていることが示唆された。

(6) 疾病モデル動物を用いた siRNA 動態解析

Colon26-NL17 担がんマウスにおいて siRNA の動態を解析した結果、PEG リポソームおよび APRPG リポソームは、高い血中滞留性を示す全身からの強いシグナルが観察された。また、腫瘍組織への集積は siRNA 単独およびカチオニックリポソームでは観察されなかった一方、PEG リポソームならびに APRPG リポソームは腫瘍部位でのシグナルが観察された (図5)。腫瘍組織の放射線量をガンマカウンターにより測定したところ、siRNA 単独は速やかな排泄、カチオニックリポソームは肺への集積によってがんへ送達されなかったのに比べ、PEG リポソーム、APRPG リポソームではがんへの集積が確認された。

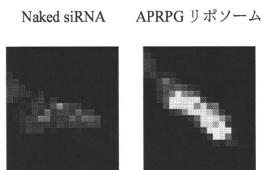


図5 ^{18}F 標識 siRNA のがんへの集積

D. 考察

はじめに、ポジトロン標識 siRNA の設計と合成について検討した。siRNA の検出方法として、LC/ESI-TOF-MS の分析条件を確立した。同様にポジトロン標識 siRNA を分離可能な分析条件を確立し、PET 解析の基礎的検討に着手した。具体的には、 ^{18}F -siRNA を用い、各種ベクターに搭載した siRNA 体内動態の PET 解析、PET と蛍光法の比較について検討した。siRNA の体内動態を解析するにあたり、カチオニックリポソームとポリエチレングリコール修飾リポソームを siRNA のベクターとして用い、siRNA 単体の体内動態と比較検討した。これまでの検討結果より、カチオニックリポソームを小動物に静脈内投与した場合、その表面電荷の影響によって初回通過臓器である肺へ集積することが明らかとなっている。一方、PEG 修飾によってその電荷をマスクしたりリポソームは、肺や他の細網内皮系組織による捕捉を回避して高い血中滞留性を示し、カチオニックリポソームとは顕著に異なる体内動態を示すことが明らかとなっている。今回、このような体内動態がまったく異なるリポソームを siRNA ベクターとして用い、 ^{18}F -siRNA の体内動態を比較評価した。結果に示したように、 ^{18}F -siRNA は用いたベクターの性質に依存した体内動態を示し、siRNA が血清中で分解を受けず、ベクターとともに存在していることが示唆された。今回得られた PET イメージデータは、解剖後の各臓器における放射活性データや蛍光法の *ex vivo* データとも結果が一致しており、 ^{18}F -siRNA の体内分布を反映しているものと考えられる。以上より、用いたベクターの性質に依存して siRNA の体内動態が変化する様子を非侵襲的かつリアルタイムに PET イメージングすることに成功したと考えられる。

一方で、PET と蛍光法の比較についても検討を実施し、PET 解析技術の有効性を評価した。非侵襲的な *in vivo* イメージデータ間で両者を比較した場合は、体表面からの深度の影響を受けない

PETが有利であることが明確に示された。PET解析データと蛍光法の *ex vivo* データが一致しているため、*in vivo* データ間の差は、siRNAの分布が実際に変化したわけではなく、測定原理に基づく差に由来したと考えられる。以上より、PETと蛍光法のデータ間には測定原理に基づく差が生じるものの、蛍光法はPET解析データの検証に有効であることが明らかとなった。なお、蛍光法は長時間の測定が可能など、PETとはまた異なる利点があり、それぞれの技術を組み合わせることで、より詳細な体内動態解析が可能になると考えられる。

次に、化学修飾 siRNA の PET 動態解析等の応用研究に取り組んだ。本研究で用いたコレステロール結合 siRNA は、静脈投与後に HDL、LDL、アルブミンなどの血中リポプロテインと結合し、安定的に肝臓に送達可能なことが報告されている。今回、PET 解析を実施したところ、コレステロール結合 siRNA は、naked siRNA と比較して血中滞留性が高く、肝臓に集積性を示した。これらの知見は、これまで報告されている論文とも整合性が得られ、コレステロール結合 siRNA の体内動態のリアルタイムかつ非侵襲的な解析に初めて成功したと考えられる。したがって siRNA の化学修飾の効果の評価に本技術が有用であることが示唆された。

我々が独自に開発した siRNA デリバリーシステムの評価を PET 解析によって実施した。具体的には ¹⁸F 標識コレステロール結合 siRNA を TEPA リポソームに搭載し、siRNA 動態を解析した。その結果、コレステロール結合 siRNA は、一部は細網内皮系組織に捕捉されたものの、高い血中滞留性を示し、新規ベクターの体内動態試験結果とほぼ一致していた。これは siRNA のコレステロール修飾により、静電的相互作用のみならず疎水性相互作用によって siRNA がリポソームベクターに保持された結果を反映したと考えられる。短鎖の siRNA は、生体内においてベクターから乖離する

可能性があり、ベクターではなく活性本体である siRNA の PET イメージングは非常に有効である。

本技術は siRNA が標的の疾患部位にどれだけ送達されているかを評価するのにも有効な手段であると考えられる。そこで、実際に担がんマウスにおいて siRNA の体内動態を解析し、がんへの送達量を定量した。その結果、PEG リポソームおよび APRPG リポソームに搭載した siRNA は、高い血中滞留性を示し、がんへの集積が観察された。これは、両リポソームが enhanced permeability and retention (EPR) 効果によりがんを集積したものと考えられる。また、腫瘍血管内皮に標的化した APRPG リポソームに搭載した siRNA は、アクティブターゲティング効果によって集積したことが考えられる。

E. 結論

DDS 医薬品の製剤設計を行うにあたり、薬物本体の体内動態解析は非常に重要である。本検討では、siRNA ベクターの体内動態解析では得られない siRNA 本体の動態解析を可能とし、治療効果を予測することや DDS 製剤設計にフィードバックするうえで非常に貴重な情報が得られることを明らかにした。したがって、siRNA やそのベクターなどにおいて有望なシーズを保有している企業ならびに公的機関に対して魅力的な動態解析技術を提供可能となった。医薬品候補の siRNA の体内動態に関して有益な情報が得られることにより、RNA 創薬の開発効率を高め、創薬の加速化に結び付くと考えられる。さらに PET 技術は、ヒトマイクロドーズ試験への応用に発展する可能性を有しており、これが実現すればさらなる開発効率の向上が期待できる。本研究事業の成果により、国民を悩ます疾病の克服を目指した医薬品開発にプラスの波及効果を生むことができれば幸甚である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asai, T., Matsushita, S., Kenjo, E., Tsuzuku, T., Yonenaga, N., Koide, H., Hatanaka, K., Dewa, T., Nango, M., Maeda, N., Kikuchi, H., Oku, N.: Dicetyl phosphate-tetraethylenepentamine-based liposomes for systemic siRNA delivery. *Bioconjug. Chem.* **22**, 429-435 (2011)
- 2) Honda, M., Asai, T., Umemoto, T., Araki, Y., Oku, N., Tanaka, M.: Suppression of choroidal neovascularization by intravitreal injection of liposomal SU5416. *Arch. Ophthalmol.* **129**, 317-321 (2011)
- 3) Oku, N., Yamashita, M., Katayama, Y., Urakami, T., Hatanaka, K., Shimizu, K., Asai, T., Tsukada, H., Akai, S., Kanazawa, H.: PET imaging of brain cancer with positron emitter-labeled liposomes. *Int. J. Pharm.* **403**, 170-177 (2011)
- 4) Katanasaka, Y., Ishii, T., Asai, T., Naitou, H., Maeda, N., Koizumi, F., Miyagawa, S., Ohashi, N., Oku, N.: Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. *Int. J. Cancer.* **127**, 2685-2698 (2010)
- 5) Dewa, T., Asai, T., Tsunoda, Y., Kato, K., Baba, D., Uchida, M., Sumino, A., Niwata, K., Umemoto, T., Iida, K., Oku, N., Nango, M.: Liposomal polyamine-dialkyl phosphate conjugates as effective gene carriers: chemical structure, morphology, and gene transfer activity. *Bioconjug. Chem.* **21**, 844-852 (2010)
- 6) Hatanaka, K., Asai, T., Koide, H., Kenjo, E., Tsuzuku, T., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.: Development of double-stranded siRNA labeling method using positron emitter and its in vivo trafficking analyzed by positron emission tomography. *Bioconjug. Chem.* **21**, 756-763 (2010)
- 7) Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K., Akai, S., Ishii, T., Kenjo, E., Ishida, T., Kiwada, H., Tsukada, H., Oku, N.: T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes. *Int. J. Pharm.* **392**, 218-223 (2010)
- 8) Ishii, T., Asai, T., Urakami, T., Oku, N.: Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion. *Brain Res.* **1321**, 164-168 (2010)
- 9) Shimizu, K., Osada, M., Takemoto, K., Yamamoto, Y., Asai, T., Oku, N.: Temperature-dependent transfer of amphotericin B from liposomal membrane of AmBisome to fungal cell membrane. *J. Control. Release*, **141**, 208-215 (2010)
- 10) Murase, Y., Asai, T., Katanasaka, Y., Sugiyama, T., Shimizu, K., Maeda, N., Oku, N.: A novel DDS strategy, "dual-targeting", and its application for antineovascular therapy. *Cancer Lett.*, **287**, 165-171 (2010)
- 11) Urakami, T., Sakai, K., Asai, T., Fukumoto, D., Tsukada, H., Oku, N.: Evaluation of O-[(18)F] fluoromethyl-d-tyrosine as a radiotracer for tumor imaging with positron emission tomography. *Nucl. Med. Biol.*, **36**, 295-303. (2009)
- 12) Takahama, H., Minamino, T., Asanuma, H., Fujita, M., Asai, T., Wakeno, M., Sasaki, H., Kikuchi, H., Hashimoto, K., Oku, N., Asakura, M., Kim, J., Takashima, S., Komamura, K., Sugimachi, M., Mochizuki, N., Kitakaze, M.: Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **53**, 709-717. (2009)
- 13) Urakami, T., Kawaguchi, A.T., Akai, S.,

- Hatanaka, K., Koide, H., Shimizu, K., Asai, T., Fukumoto, D., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.: In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography. *Artif. Organs*, **33**, 164-168. (2009)
- 14) Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K., Urakami, T., Ishii, T., Kenjo, E., Nishihara, M., Yokoyama, M., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N.: Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon. *Int. J. Pharm.*, **362**, 197-200. (2008)
- 15) Katanasaka, Y., Ida, T., Asai, T., Maeda, N., Oku, N.: Effective delivery of an angiogenesis inhibitor by neovessel-targeted liposomes. *Int. J. Pharm.* **360**, 219-224. (2008)
- 16) Katanasaka, Y., Ida, T., Asai, T., Shimizu, K., Koizumi, F., Maeda, N., Baba, K., Oku, N.: Antiangiogenic cancer therapy using tumor vasculature-targeted liposomes encapsulating 3-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-1,3-dihydro-indol-2-one, SU5416. *Cancer Lett.*, **270**, 260-268. (2008)
2. 学会発表
・招待講演
- 1) リポソームを用いた全身投与型 siRNA デリバリーシステムの開発. 第 28 回製剤設計研究会, 2010 年 10 月 23 日, 東京
- 2) がんの RNA 干渉治療を目的とした全身投与型 siRNA ベクターの開発. 日本薬学会第 130 年会, 一般シンポジウム S10 「異分野技術の融合による次世代の医療基盤技術の構築に向けて」, 2010 年 3 月 29 日, 岡山
- 3) Development of PET technology to determine pharmacokinetics of siRNA medicine. APSTJ Global Education Seminar East 2009-03, 5 October, 2009, Tokyo, Japan
- 4) siRNA 体内動態の PET 解析と新規ベクターの開発. 第 25 回日本 DDS 学会, ワークショップ 1 「核酸医薬の DDS」, 2009 年 7 月 3 日, 東京
- 5) Asai, T., Oku, N.: Angiogenic vessel-targeted liposomes for *in vivo* delivery of siRNA. Japan Society of Gene Therapy The 14th Annual Meeting 2008 (Sapporo, Japan) Educational Seminar V-1. 2008 年 6 月 14 日
- 6) Asai, T., Oku, N.: Angiogenic vessel-targeted liposomal DDS for cancer treatment. 11th Liposome Research Days Conference (Yokohama, Japan) Program book, p.63. 2008 年 7 月 20 日
- ・一般講演
- 1) 畑中剣太郎, 浅井知浩, 原田典弘, 塚田秀夫, 奥直人: ポジトロン標識 siRNA による DDS 研究への応用. 第 10 回放射医薬品・画像診断薬研究会, 2010 年 12 月 4 日, 京都
- 2) 加藤清志, 出羽毅久, 上妻裕介, 沖田陽介, 角野 歩, 飯田浩史, 浅井知浩, 奥直人, 南後 守: 遺伝子送達能を有するポリアミン脂質の開発とその機能評価: 原子間力顕微鏡による DNA 複合体の形態観察とその作用機構. 第 19 回 DDS カンファレンス, 2010 年 9 月 4 日, 静岡
- 3) Asai, T., Hatanaka, K., Koide, H., Shimizu, K., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.: Pharmacokinetic PET studies of liposomal siRNA. LRD/LLMB 2010 Conference, 2010 年 8 月 4~7 日, Vancouver, Canada
- 4) Tsuzuku, T., Asai, T., Matsushita, S., Dewa, T., Nango, M., Maeda, N., Oku, N.: Development of *in vivo* delivery system for siRNA-based cancer therapy. LRD/LLMB 2010 Conference, 2010 年 8 月 4~7 日, Vancouver, Canada
- 5) Dewa, T., Kato, K., Kozuma, Y., Okita, Y., Sumino, A., Asai, T., Oku, N., Nango, M.: Liposomal polyamine-dialkyl phosphate

- conjugates as effective gene carriers: Chemical structure, morphology, and gene transfer activity. LRD/LLMB 2010 Conference, 2010年8月4~7日, Vancouver, Canada
- 6) 浅井知造, 畑中劍太郎, 小出裕之, 原田典弘, 塚田秀夫, 奥 直人: RNA 創薬に向けた siRNA 体内動態の PET イメージング. 第 56 回 日本薬学会東海支部 総会・大会, 2010年7月3日, 岐阜
 - 7) 米永憲史, 見城江利也, 都竹拓磨, 浅井知造, 南後 守, 出羽毅久, 奥 直人: 新規 PCL を用いた全身投与型 siRNA デリバリーシステムのがん治療への応用. 第 26 回 DDS 学会, 2010年6月17日, 大阪
 - 8) 平島幸治, 浅井知造, 梅本拓也, 三原基弘, 宮川眞一, 奥 直人: ミトコンドリア標的化 p53 を用いた新規がん遺伝子治療法の開発. 第 74 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 2010年5月29日, 名古屋
 - 9) 畑中劍太郎, 浅井知造, 小出裕之, 原田典弘, 塚田秀夫, 奥 直人: RNA 創薬研究におけるポジトロン標識 siRNA の PET 体内動態イメージング. 日本薬剤学会第 25 年会, 2010年5月12日, 徳島
 - 10) 小出裕之, 浅井知造, 南後 守, 出羽毅久, 前田典之, 奥 直人: mTOR を標的とした腫瘍新生血管障害療法の開発. 日本薬剤学会第 25 年会, 2010年5月12日, 徳島
 - 11) Asai, T., Hatanaka, K., Koide, H., Shimizu, K., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.: PET technology to determine pharmacokinetics of liposomal siRNA. 4th International Liposome Society Conference, 2009年12月14日, London, UK
 - 12) Kenjo, E., Asai, T., Matsushita, S., Dewa, T., Nango, M., Maeda, N., Oku, N.: Development of siRNA delivery system using novel polycation liposomes for cancer therapy. 4th International Liposome Society Conference, 2009年12月14日, London, UK
 - 13) 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, 2009年12月14日, London, UK
 - 14) Tsuzuku, T., Asai, T., Matsushita, S., Dewa, T., Nango, M., Maeda, N., Oku, N.: Development of in vivo delivery system for siRNA-based cancer therapy. 第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2009年11月30日, 大阪
 - 15) 畑中劍太郎, 浅井知造, 小出裕之, 原田典弘, 塚田秀夫, 奥 直人: RNA 創薬研究における PET イメージング技術の開発. 第 9 回放射線医薬品・画像診断薬研究会, 2009年11月14日, 京都
 - 16) Kato, K., Uchida, M., Sumino, A., Dewa, T., Asai, T., Oku, N., Nango, M.: Polyamine-lipid/DNA Complexes as Gene Carriers: Morphological Observation of the Complexes by Using AFM. 3rd International Symposium on Nanomedicine, 2009年11月5日, 岡崎
 - 17) Dewa, T., Kato, K., Uchida, M., Sumino, A., Asai, T., Oku, N., Nango, M.: Liposomal Polyamine-Dialkyl Phosphate Conjugates as Effective Gene Carriers: Chemical Structure, Morphology, and Gene Transfer Activity. 3rd International Symposium on Nanomedicine, 2009年11月5日, 岡崎
 - 18) 出羽毅久, 加藤清志, 内田みさ, 角野 歩, 浅井知造, 奥 直人, 南後 守: ポリアミン脂質による遺伝子送達と DNA 複合体形態の直接観察. 第 58 回高分子討論会. 2009年9月16日, 熊本
 - 19) 出羽毅久, 加藤清志, 内田みさ, 角野 歩, 浅井知造, 奥 直人, 南後 守: ポリアミン脂質

- DNA 複合体の AFM による形態観察と遺伝子送達能. 第 19 回バイオ・高分子シンポジウム, 2009 年 7 月 29 日, 東京
- 20) Hatanaka, K., Asai, T., Koide, H., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.: Development of PET technology for the pharmacokinetic study of siRNA medicine. 36th Annual Meeting & Exposition of Controlled Release Society, 2009 年 7 月 20 日, Copenhagen, Denmark
- 21) 庭田佳代子、浅井知浩、出羽毅久、南後 守、奥 直人：ポリカチオンリポソームを用いた遺伝子導入におけるポリアミン構造が導入効率に及ぼす効果. 日本薬剤学会第 23 回年会（札幌）、講演要旨集、p.132. 2008 年 5 月 20 日
- 22) Matsushita, S., Asai, T., Suzuki, Y., Ishida, T., Maeda, N., Dewa, T., Kiwada, H., Nango, M., Oku, N.: Development of angiogenic vessel-targeted polycation liposomes for delivering small interfering RNA. 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (New York, USA) Program book, p.88. 2008 年 7 月 16 日
- 23) Niwata, K., Asai, T., Dewa, T., Nango, M., Oku, N.: Development of novel polycation liposomes for gene transfer system. 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (New York, USA) Program book, p.88. 2008 年 7 月 16 日
- 24) Oku, N., Urakami, T., Asai, T., Akai, S., Tsukada, H., Kawaguchi, A.: Microdosing test for liposomal drugs. 11th Liposome Research Days Conference (Yokohama, Japan) Program book, p.73. 2008 年 7 月 20 日
- 25) Katayama, Y., Urakami, T., Akai, S., Yokoyama, M., Kawaguchi, A., Tsukada, H., Asai, T., Oku N.: A novel labeling method for PET imaging on the development of liposomal DDS drugs. 11th Liposome Research Days Conference (Yokohama, Japan) Program book, p.128. 2008 年 7 月 20 日
- 26) Kenjo, E., Tsuruta, A., Hatanaka, K., Asai, T., Dewa, T., Nango, M., Oku, N.: Development of liposomal siRNA targeting tumor angiogenic vessels. 11th Liposome Research Days Conference (Yokohama, Japan) Program book, p.257. 2008 年 7 月 21 日
- 27) Matsushita, S., Asai, T., Suzuki, Y., Tatsuhiro Ishida, Noriyuki Maeda, Takehisa Dewa, Hiroshi Kiwada, Mamoru Nango, Naoto Oku: Antiangiogenic effect by Argonaute2 knockdown used polycation liposome. 11th Liposome Research Days Conference (Yokohama, Japan) Program book, p.171. 2008 年 7 月 22 日
- 28) 片山百合恵、浦上武雄、山下美菜、赤井周司、川口 章、塚田秀夫、浅井知浩、奥 直人：病態モデルラットにおけるリポソーム製剤の PET 動態解析. 第 17 回 DDS カンファレンス（静岡）、講演要旨集、p.14. 2008 年 9 月 20 日
- G. 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
Asai, T., Matsushita, S., Kenjo, E., Tsuzuku, T., Yonemura, N., Koide, H., Hatanaka, K., Dewa, T., Nango, M., Maeda, N., Kikuchi, H., Oku, N.	Dicetyl phosphate-tetraethylamine-based liposomes for systemic siRNA delivery.	<i>Bioconjug. Chem.</i>	22	429-435	2011
Honda, M., Asai, T., Umemoto, T., Araki, Y., Oku, N., Tanaka, M.	Suppression of choroidal neovascularization by intravitreal injection of liposomal SU5416.	<i>Arch. Ophthalmol.</i>	129	317-321	2011
Oku, N., Yamashita, M., Katayama, Y., Urakami, T., Hatanaka, K., Shimizu, K., Asai, T., Tsukada, H., Akai, S., Kanazawa, H.	PET imaging of brain cancer with positron emitter-labeled liposomes.	<i>Int. J. Pharm.</i>	403	170-177	2011
Katanasaka, Y., Ishii, T., Asai, T., Naitou, H., Maeda, N., Koizumi, F., Miyagawa, S., Ohashi, N., Oku, N.	Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78.	<i>Int. J. Cancer.</i>	127	2685-2698	2010
Dewa, T., Asai, T., Tsunoda, Y., Kato, K., Baba, D., Uchida, M., Sumino, A., Niwata, K., Umemoto, T., Iida, K., Oku, N., Nango, M.	Liposomal polyamine-dialkyl phosphate conjugates as effective gene carriers: chemical structure, morphology, and gene transfer activity.	<i>Bioconjug. Chem.</i>	21	844-852	2010
Hatanaka, K., Asai, T., Koide, H., Kenjo, E., Tsuzuku, T., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.	Development of double-stranded siRNA labeling method using positron emitter and its in vivo trafficking analyzed by positron emission tomography.	<i>Bioconjug. Chem.</i>	21	756-763	2010

Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K., Akai, S., Ishii, T., Kenjo, E., Ishida, T., Kiwada, H., Tsukada, H., Oku, N.	T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes.	<i>Int. J. Pharm.</i>	392	218-223	2010
Ishii, T., Asai, T., Urakami, T., Oku, N.	Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion.	<i>Brain Res.</i>	1321	164-168	2010
Murase, Y., Asai, T., Katanasaka, Y., Sugiyama, T., Shimizu, K., Maeda, N., Oku, N.	A novel DDS strategy, "dual-targeting", and its application for antineoplastic vascular therapy.	<i>Cancer Lett.</i>	287	165-171	2010
Shimizu, K., Osada, M., Takemoto, K., Yamamoto, Y., Asai, T., Oku, N.	Temperature-dependent transfer of amphotericin B from liposomal membrane of AmBisome to fungal cell membrane.	<i>J. Control. Release</i>	141	208-215	2010
Urakami, T., Sakai, K., Asai, T., Fukumoto, D., Tsukada, H., Oku, N.	Evaluation of O-[(18)F]fluoromethyl-d-tyrosine as a radiotracer for tumor imaging with positron emission tomography.	<i>Nucl Med Biol.</i>	36	295-303	2009
Takahama, H., Minamino, T., Asanuma, H., Fujita, M., Asai, T., Wakeno, M., Sasaki, H., Kikuchi, H., Hashimoto, K., Oku, N., Asakura, M., Kim, J., Takashima, S., Komamura, K., Sugimachi, M., Mochizuki, N., Kitakaze, M.	Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats.	<i>J. Am. Coll. Cardiol.</i>	53	709-717	2009
Urakami, T., Kawaguchi, A.T., Akai, S., Hatanaka, K., Koide, H., Shimizu, K., Asai, T., Fukumoto, D., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.	In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography.	<i>Artif. Organs</i>	33	164-168	2009

Koide, H., <u>Asai</u> , T., Hatanaka, K., Urakami, T., Ishii, T., Kenjo, E., N ishihara, M., Yok oyama, M., Ishid a, T., Kiwada, H., Oku, N.	Particle size-dependent t riggering of accelerated blood clearance pheno menon.	<i>Int. J.</i> <i>Pharm.</i>	362	197-200	2008
Katanasaka, Y., I da, T., <u>Asai</u> , T., Maeda, N., Oku, N.	Effective delivery of an angiogenesis inhibitor by neovessel-targeted li posomes.	<i>Int. J.</i> <i>Pharm.</i>	360	219-224	2008
Katanasaka, Y., I da, T., <u>Asai</u> , T., Shimizu, K., Koiz umi, F., Maeda, N., Baba, K., Ok u, N.	Antiangiogenic cancer t herapy using tumor vas culature-targeted liposo mes encapsulating 3-(3, 5-dimethyl-1H-pyrrol-2-y lmethylene)-1,3-dihydro- indol-2-one, SU5416.	<i>Cancer Lett.</i>	270	260-268	2008

Dicetyl Phosphate-Tetraethylenepentamine-Based Liposomes for Systemic siRNA Delivery

Tomohiro Asai,^{†*} Saori Matsushita,[†] Eriya Kenjo,[†] Takuma Tsuzuku,[†] Norihito Yonenaga,[†] Hiroyuki Koide,[†] Kentaro Hatanaka,[†] Takehisa Dewa,[‡] Mamoru Nango,[‡] Noriyuki Maeda,[§] Hiroshi Kikuchi,[†] and Naoto Oku[†]

[†]Department of Medical Biochemistry and Global COE, University of Shizuoka Graduate School of Pharmaceutical Sciences, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

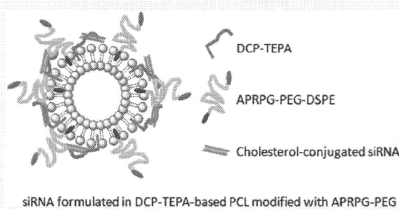
[‡]Department of Life and Materials Engineering Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8555, Japan

[§]Nippon Fine Chemical Co. Ltd., 5-1-1 Umei, Takasago, Hyogo 676-0074, Japan

[‡]DDS Research, Formulation Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., 5-1-3 Tokodai, Tsukuba, 300-2635, Japan

Supporting Information

ABSTRACT: Dicetyl phosphate-tetraethylenepentamine (DCP-TEPA) conjugate was newly synthesized and formed into liposomes for efficient siRNA delivery. Formulation of DCP-TEPA-based polycation liposomes (TEPA-PCL) complexed with siRNA was examined by performing knockdown experiments using stable EGFP-transfected HT1080 human fibrosarcoma cells and siRNA for GFP. An adequate amount of DCP-TEPA in TEPA-PCL and N/P ratio of TEPA-PCL/siRNA complexes were determined based on the knockdown efficiency. Then, the biodistribution of TEPA-PCL modified with poly(ethylene glycol) (PEG) was examined in BALB/c mice. As a result, TEPA-PCL modified with PEG6000 avoided reticuloendothelial system uptake and showed long circulation in the bloodstream. On the other hand, PEGylation of TEPA-PCL/siRNA complexes caused dissociation of a portion of the siRNA from the liposomes. However, we found that the use of cholesterol-conjugated siRNA improved the interaction between TEPA-PCL and siRNA, which allowed PEGylation of TEPA-PCL/siRNA complexes without siRNA dissociation. In addition, TEPA-PCL complexed with cholesterol-conjugated siRNA showed potent knockdown efficiency in stable luciferase-transfected B16-F10 murine melanoma cells. Finally, the biodistribution of cholesterol-conjugated siRNA formulated in PEGylated TEPA-PCL was examined by performing near-infrared fluorescence imaging in Colon26 NL-17 murine carcinoma-bearing mice. Our results showed that tumor targeting with siRNA via systemic administration was achieved by using PEGylated TEPA-PCL combined with active targeting with Ala-Pro-Arg-Pro-Gly, a peptide used for targeting angiogenic endothelium.



INTRODUCTION

RNA interference (RNAi) refers to post-transcriptional gene silencing induced by double-stranded RNA.^{1,2} Small RNAs such as small interfering RNA (siRNA) and microRNA (miRNA) are expected to become novel drug therapeutics for intractable diseases such as cancer.³ Compared with local injection of siRNA drug candidates, systemic injection of them is quite limited at present because of a serious problem of siRNA delivery,^{4,5} i.e., naked RNA is readily degraded by nucleases and poorly penetrates plasma membrane of target cells. Thus, establishment of an siRNA delivery system is a major challenge for the development of RNAi-based drugs.⁶ In recent studies, a variety of drug delivery system (DDS) technologies such as liposomes,⁷ micelles,⁸ other nanoparticles,^{9,9} and cholesterol-conjugation¹⁰ of siRNA have been investigated for siRNA delivery. Also, useful nonviral

vectors enabling both potent gene silencing in target cells and *in vivo* delivery to target cells have been awaited to achieve siRNA therapy via systemic administration.

We reported earlier that polycation liposomes (PCL), one of the nonviral vectors, possess the advantages of both liposomes and polycations for the delivery of plasmid DNA and siRNA.^{11–17} Previously, we synthesized cetylated polyethylenimine-[1800] (cetyl-PEI[1800]) and polycation (spermidine, spermine or PEI[1800])-dialkyl phosphate conjugates to prepare various types of PCLs.^{11–15} PCLs are simply prepared with these conjugates through anchoring via the hydrophobic portion of

Received: October 25, 2010

Revised: January 26, 2011

Published: March 01, 2011

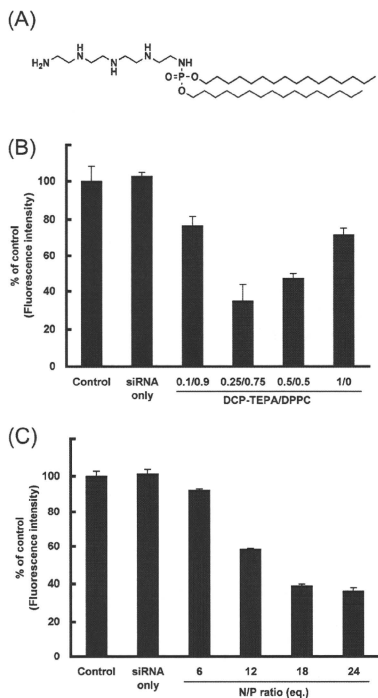


Figure 1. Preparation of DCP-TEPA-based liposomes for efficient siRNA delivery. (A) Chemical structure of DCP-TEPA. (B) Effect of DCP-TEPA amount in TEPA-PCL on the knockdown efficiencies. siGFP (25 pmol, N/P = 24 equiv) was formulated in TEPA-PCL composed of DCPTEPA/DOPE/DPPC/cholesterol = X/1/Y/1. DCP-TEPA/DPPC = X/Y is indicated in the figure. (C) Determination of an adequate N/P ratio of TEPA-PCL/siRNA by performing a similar knockdown experiment. (B, C) EGFP/HT1080 cells (4×10^6 cells/well) were precultured overnight. TEPA-PCL complexed with siGFP (25 pmol, N/P = 6–24 equiv) was added to these cells and then removed after a 24 h incubation. These cells were subsequently cultured for an additional 24 h. The fluorescence intensities of EGFP were measured and corrected for protein amounts. The control is that of cells not transfected with siGFP. Data are presented as the percentage of control fluorescence intensities with SD bars.

the conjugate. Our previous results indicate that PCLs containing cetyl-PEI[1800] (cetyl-PEI-PCL), dicycyl phosphate (DCP)-spermidine or DCP-spermine possess high gene transfer activity without severe cytotoxicity.^{11,14} A possible mechanism of gene transfer with cetyl-PEI-PCL is internalization of cetyl-PEI-PCL/plasmid DNA complexes into cells via the endocytic pathway, followed by the release of plasmid DNA from the endosomes through the “proton-sponge” effect of PEI.¹⁵ Intravenous injection

of cetyl-PEI-PCL complexed with a plasmid DNA encoding luciferase can drive gene expression in the first-pass organs in mice.¹⁶ Our previous results also demonstrate that siRNA formulated in cetyl-PEI-PCL can induce efficient gene silencing *in vitro*.¹⁷ However, cetyl-PEI-PCL accumulates in the first-pass organs and reticuloendothelial system (RES) after intravenous injection, which makes it difficult to deliver siRNA to target cells. Our recent study using positron emission tomography (PET) demonstrates that ¹⁸F-labeled siRNA formulated in cationic liposomes accumulates in the lungs of mice immediately after intravenous injection via a tail vein.¹⁸

Poly(ethylene glycol) (PEG) forms a water shell on the liposomal surface and provides a steric barrier to avoid interactions with plasma proteins, resulting in escape from trapping by the RES.^{19,20} Therefore, PEGylated liposomes have a property of long circulation in the bloodstream and are useful for drug and gene delivery to inflamed sites such as tumors through the enhanced permeability and retention (EPR) effect.²¹ An important aspect of PEGylation of liposomes is that it serves for not only RES-avoidance but also improvement of undesirable properties of liposomes.²² In general, PEGylation of cationic liposomes can reduce their nonspecific binding to plasma proteins and improves their biodistribution. However, our previous data indicate that modification with PEG6000 cannot improve the biodistribution of PCL containing PEI[1800]. It is considered that the molecular size of PEI[1800] is too large to improve the undesirable properties of PCL by PEG6000 modification.

In the present study, dicycylphosphate-tetraethylenepentamine (DCP-TEPA, Figure 1A) was newly synthesized and formed into liposomes for efficient siRNA delivery based on our previous results. Furthermore, DCP-TEPA-based PCL (TEPA-PCL) was PEGylated and applied to systemic delivery of siRNA.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Synthesis of DCP-TEPA. Dicycyl phosphate and tetraethylenepentamine were purchased from Sigma-Aldrich and Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan), respectively. DCP-TEPA was synthesized by using a procedure analogous to that reported previously,^{13,14} i.e., two-step reactions, (i) dimerization of dicycyl phosphate anhydride and (ii) nucleophilic substitution with tetraethylenepentamine, provided the conjugate. Dimerized dicycyl phosphate anhydride (323 mg, 0.3 mmol) in anhydrous pyridine (2.0 mL) was added to a solution of tetraethylenepentamine (351 mg, 1.85 mmol) in 1.0 mL of anhydrous pyridine. The reaction mixture was stirred under nitrogen atmosphere for 4 h at room temperature. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was suspended in distilled water and then filtered to remove any unreacted polyamine. The residue was subjected to column chromatography using aminated silica gel (Chromatorex NH, Fuji Silisia Chemical LTD, Aichi, Japan) with an eluting solution of $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (39/1, v/v), giving 129 mg (60%) as a white solid. ¹H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 6H), 1.25 (s, 52H), 1.34–1.37 (m, 4H), 1.65–1.67 (m, 6H), 2.41–3.24 (bm, 16H), 3.93–4.00 (bm, 4H); MALDI-TOF-MS for $(\text{C}_{40}\text{H}_{89}\text{N}_5\text{O}_3)_+$ calcd 718.7, found 718.2.

Preparation of DCP-TEPA-Based Liposomes for siRNA Delivery. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, PEG2000-distearylphosphatidylethanolamine (DSPE), PEG6000-DSPE, and Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG)-PEG6000-DSPE

were products of Nippon Fine Chemical Co. (Takasago, Hyogo, Japan). Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) was purchased from NOF Co. (Tokyo, Japan). Alexa Fluor 750-labeled control siRNA (AF750-siCont) was obtained from Japan Bio Services Co., Ltd. (Saitama, Japan). All other siRNAs including cholesterol-conjugated ones were purchased from Hokkaido System Science Co. (Hokkaido, Japan). The nucleotide sequences of siRNA for GFP (siGFP) with a 2-nucleotide overhang (underline) were 5'-GGCUACGUCCAGGAGCCACC-3' (sense) and 5'-UGCGCUCUGGACGUAGCCUU-3' (antisense); for luciferase (siLuc), 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT-3' (sense) and 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAAGTT-3' (antisense); for enhanced luciferase 2 (siLuc2), 5'-GCUAUGGGCU-GAAUACAAATT-3' (sense) and 5'-UUUGUAUUCAGCC-CAUAGCTT-3' (antisense); and for the control (siCont), 5'-CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUGCAG-3' (sense) and 5'-GCAAUAGAGCCGGUCUAGCGAAUUGAU-3' (antisense). In the case of AF750-siCont, AF750 was conjugated with siCont at the 3'-prime end of the antisense strand. In the case of cholesterol-conjugated siRNA (siRNA-C), cholesterol was conjugated with siRNA at the 3'-prime of the sense strand.

DCP-TEPA, DOPE, DPPC, and cholesterol were dissolved in *t*-butyl alcohol and freeze-dried. TEPA-PCL was prepared by hydration of the lipid mixture with RNase-free water. TEPA-PCL was sized by extruding it 10 times through a polycarbonate membrane filter having a pore size of 100 nm (Nuclepore, Maidstone, UK). TEPA-PCL and siRNA (or siRNA-C) were mixed gently and incubated for 20 min at room temperature to form TEPA-PCL/siRNA complexes. The ratio of the nitrogen moiety of TEPA-PCL to the phosphorus one of siRNA (N/P ratio) was varied from 6 to 48 equiv to examine the formulation, and was then fixed at 18 equiv based on the results. For systemic administration, TEPA-PCL (or TEPA-PCL/siRNA-C complexes) was incubated with PEG2000-DSPE, PEG6000-DSPE, or APRPG-PEG6000-DSPE dissolved in RNase-free water at 50 °C for 15 min. The percent molar ratio of PEG-conjugates to total lipids was 10% or 20%. Particle size and ζ -potential of TEPA-PCL-based siRNA vectors diluted with RNase-free water were measured by using a Zetasizer Nano ZS and MPT-2 (Malvern, Worcs, UK). Free siRNA dissociated from TEPA-PCL was separated by electrophoresis in 15% acrylamide gel and visualized by ethidium bromide staining. TEPA-PCL complexed with siLuc or siLuc-C was used for this gel electrophoresis experiment.

Cell Cultures. HT1080 human fibrosarcoma cells constitutively expressing EGFP (EGFP/HT1080 cells) had been previously established²³ and were cultured in DME/Ham F12 medium (WAKO, Osaka, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 units/mL penicillin (MP Biomedicals, Irvine, CA), 100 μ g/mL streptomycin (MP Biomedicals), and 100 μ g/mL Geneticin (Sigma-Aldrich). A549-luc-C8 Bioware Cell Line, a luciferase-expressing cell line derived from A549 human lung carcinoma cells, and B16-F10-luc2 Bioware Ultra Cell Line, a luciferase-expressing cell line stably transfected with the firefly luciferase gene (Luc2), were purchased from Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA). Colon 26 NL-17 colon carcinoma cells, established by Dr. Yamori (Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan), were kindly provided by Dr. Nakajima (Johnson & Johnson KK, Tokyo, Japan). A549-luc-C8, B16-F10-luc2, and Colon26 NL-17 cells were cultured in DME/Ham F12 medium supplemented with 10% FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin.

Experimental Animals. Five-week-old BALB/c male mice were purchased from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan). The animals were cared for according to the Animal Facility Guidelines of the University of Shizuoka. All animal experiments were approved by the Animal and Ethics Review Committee of the University of Shizuoka.

Evaluation of RNAi Efficiencies *In Vitro*. EGFP/HT1080 cells were seeded onto 24-well FALCON plates (BD Bioscience, San Jose, CA) at the density of 4×10^4 cells/well and precultured overnight. Before siRNA transfection, the medium was changed to a fresh one containing 10% FBS but no antibiotics. TEPA-PCL complexed with siGFP (25 pmol, N/P = 6–48 equiv) were added to the medium at a final siRNA concentration of 50 nM and removed after 24 h incubation. These cells were subsequently cultured for an additional 24 h and then lysed with 1% reduced Triton-X100 containing protease inhibitors (2 mM PMSF, 200 μ M leupeptin, 50 μ g/mL aprotinin, and 100 μ M pepstatin A). The fluorescence intensities of EGFP were measured by using a Tecan Infinite M200 microplate reader (Salzburg, Austria) and corrected for protein amounts by using a BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE Biotechnology, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions.

A549-luc-C8 or B16-F10-luc2 cells were seeded onto 96-well luminisc white plates (Nalge Nunc International, Naperville, IL) at the density of 5×10^3 cells/well and precultured overnight. Before siRNA transfection, the medium was changed to a fresh one containing 10% FBS but no antibiotics. TEPA-PCL complexed with siLuc, cholesterol-conjugated siLuc (siLuc-C), cholesterol-conjugated siCont (siCont-C), or cholesterol-conjugated siLuc2 (siLuc2-C) were added to the medium at a final siRNA concentration of 50–100 nM (10–20 pmol, N/P = 18 equiv) and removed after 24 h incubation. These cells were subsequently cultured for an additional 24 h and used for the luciferase assay. The luminescence intensity and cell viability were measured by using ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) and CellTiter-Fluor Cell Viability Assay (Promega), respectively, according to the manufacturer's instructions. B16-F10-luc2 cells were also transfected with siLuc2 mixed with Lipofectamine 2000 (LFA2K, Invitrogen, Rockville, MD) according to the manufacturer's instructions.

Biodistribution of TEPA-PCL in Mice after Intravenous Injection. In order to label TEPA-PCL with a radioisotope, we added a trace amount of [³H] cholesterol hexadecyl ether (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) to the initial *t*-butyl alcohol solution and freeze-dried it with the other lipids of the TEPA-PCL preparation. Five-week-old BALB/c male mice ($n = 5$) were injected with [³H]-labeled TEPA-PCL via a tail vein (74 kBq/mouse). Three hours after the injection, these mice were sacrificed under deep anesthesia for collection of the blood. The plasma was obtained by centrifugation (600 g for 5 min). Then, the heart, lungs, liver, spleen, and kidneys were removed, washed with saline, and weighed. The radioactivity in each organ was determined with a liquid scintillation counter (Aloka LSC-3100, Tokyo, Japan). The total amount in the plasma was calculated based on the body weight of the mice, where the plasma volume was assumed to be 4.27% of the body weight based on the data for total blood volume.²⁴

Near-Infrared Fluorescence Imaging of siRNA *In Vivo*. The biodistribution of AF750-siCont-C formulated in TEPA-PCL modified with 10% PEG6000 (PEG-TEPA-PCL) or 10% APRPG-PEG6000 (APRPG-TEPA-PCL) was assessed by near-infrared fluorescence (NIRF) imaging with a Xenogen IVIS

Table 1. Particle Size and ζ -Potential of TEPA-PCL-Based Nanoparticles^a

	size (nm)	PDI	ζ -potential (mV)
TEPA-PCL	134	0.172	+52.5
TEPA-PCL modified with 10% PEG2000	107	0.154	-6.92
TEPA-PCL modified with 20% PEG2000	133	0.011	-13.1
TEPA-PCL modified with 10% PEG6000	104	0.269	-6.01
TEPA-PCL modified with 20% PEG6000	135	0.402	-3.60
TEPA-PCL/siCont-C	139	0.121	+46.2
PEG-TEPA-PCL/siCont-C	98.1	0.234	+2.23
APRPG-TEPA-PCL/siCont-C	121	0.190	-0.05

^a Particle size and ζ -potential of TEPA-PCL-based nanoparticles diluted with RNase-free water were measured by using the Zetasizer Nano ZS. Lipid composition of TEPA-PCL is DCP-TEPA/DOPE/DPPC/cholesterol = 0.25/1/0.75/1 as a molar ratio. N/P ratio of TEPA-PCL/siCont-C is 18 equiv. PDI: polydispersity index.

Lumina System coupled to *Living Image* software for data acquisition (Xenogen Corp., Alameda, CA). Colon26 NL-17 cells (1.0×10^6 cells/mouse) were implanted subcutaneously into the foot of 5-week-old BALB/c male mice. These mice were fed an alfalfa-free feed (Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) to reduce the influence of background fluorescence. Ten days after tumor implantation, the carcinoma-bearing mice ($n = 3$) were anesthetized continuously via inhalation of 2% escafin (Mylan Pharmaceuticals, Morgantown, WV) and intravenously injected with AF750-siCont-C formulated in PEG-TEPA-PCL or APRPG-TEPA-PCL (15 μ g, N/P = 18 equiv) via a tail vein. The fluorescence of AF750 was acquired 10 min, 3 h, and 24 h after the injection. These mice were sacrificed under anesthesia 96 h post injection. Then, the organs (heart, lungs, liver, spleen, kidneys, and tumor) were collected and imaged *ex vivo* with the IVIS.

Statistical Analysis. Differences between groups were evaluated by analysis of variance (ANOVA) with the Tukey posthoc test.

RESULTS

Gene Silencing with DCP-TEPA-Based Liposomes. An adequate lipid composition of TEPA-PCL for siRNA transfection was examined by performing knockdown experiments using EGFP/HT1080 cells and siGFP. As shown in Figure 1B, the amount of DCP-TEPA in the PCLs clearly affected the knockdown efficiency, but did not show simple dose-dependency. The highest knockdown efficiency was obtained when the lipid composition of TEPA-PCL was DCP-TEPA/DOPE/DPPC/cholesterol = 0.25/1/0.75/1 as a molar ratio. Thus, this composition of TEPA-PCL was adopted for the subsequent experiments. Next, an adequate N/P ratio of TEPA-PCL/siRNA was determined by using the same knockdown experiment. As a result, the highest knockdown efficiency was obtained when the N/P ratio was 18 or 24 equiv (Figure 1C). The knockdown efficiency did not change even when the N/P ratio was increased up to 48 equiv (data not shown). siGFP without TEPA-PCL did not show any knockdown effect. Obvious cytotoxicity was not observed in any of the experiments (data not shown). Particle size and ζ -potential of TEPA-PCL-based nanoparticles are summarized in Table 1. The ζ -potential of TEPA-PCL under various pH conditions (pH = approximately 4.1–7.9) was also determined as an indicator of the buffering effects of TEPA in

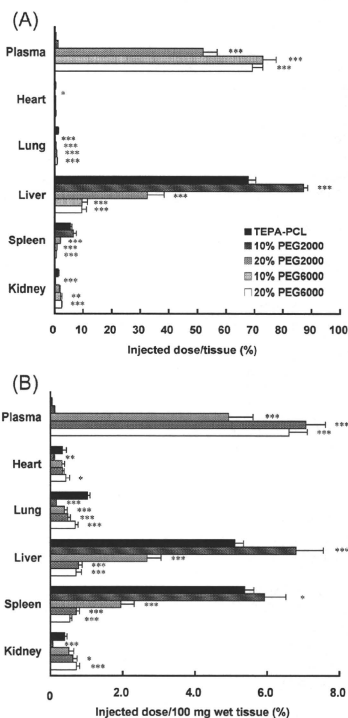


Figure 2. Biodistribution of PEGylated TEPA-PCL in mice after intravenous injection. TEPA-PCL labeled with [³H] cholesterol hexadecyl ether (74 kBq/mouse) was modified with DSPE-PEG2000 or DSPE-PEG6000. The percent molar ratio of DSPE-PEG to total lipids was 10% or 20%. BALB/c mice ($n = 5$) were injected with TEPA-PCL or PEGylated TEPA-PCL via a tail vein. Three hours after the injection, the radioactivity in each organ was determined with a liquid scintillation counter. Data are presented as % dose per tissue (A) and % dose per 100 mg tissue (B). Significant differences from the TEPA-PCL group are indicated (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

PCL and compared with that of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) liposomes. The ζ -potential of TEPA-PCL under low pH conditions was higher than that under the neutral condition, whereas that of DOTAP liposomes did not change at any pH tested (Supporting Information Figure 1).

Biodistribution of PEGylated TEPA-PCL in Mice after Intravenous Injection. The biodistribution of PEGylated TEPA-PCL was determined in 5-week-old BALB/c male mice (Figure 2). The relative amount of DSPE-PEG to total lipids affected the RES-avoidance activity in the case of TEPA-PCL modified with PEG2000: Modification of TEPA-PCL with 10 mol % PEG2000 could not avoid RES uptake, resulting in rapid