

201011030A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

固形がんの標的治療とその治療効果のMRIによる追跡を可能にする  
診断-治療機能一体型DDSの創製

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 西山 伸宏

平成23(2011)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

固形がんの標的治療とその治療効果のMRIによる追跡を可能にする  
診断-治療機能一体型DDSの創製

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 西山 伸宏

平成23（2011）年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

固形がんの標的治療とその治療効果の MRI による追跡を可能にする診断・治療機能一体型

DDS の創製 (西山 伸宏)

1

II. 分担研究報告

DACHPt/Gd-DTPA 内包ミセルの調製と物性評価 (Cabral Horacio)

6

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

9

IV. 研究成果の刊行物・別刷

11

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
総括研究報告書

固形がんの標的治療とその治療効果のMRIによる追跡を可能にする  
診断-治療機能一体型DDSの創製

研究代表者 西山伸宏 東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門 准教授

研究要旨

がん組織に選択的に集積し、がんのMRI診断に広く利用できるMRI造影剤が望まれているが、そのような造影剤は未だ開発されていないのが現状である。また、がん化学療法においては、その有効性を的確に把握する必要があり、その目的においてMRIは有効な手段であると考えられる。そこで本研究では、現在、第一相臨床試験中のDachPt内包高分子ミセルに、MRI造影剤のGd-DTPAを搭載し、DachPtによる治療効果をMRIによって追跡できる診断-治療機能一体型DDSを開発することを目指している。本年度は、前年度までに開発したDachPt/Gd-DTPA内包ミセルに関して、膵臓がん同所移植モデルにおけるMRIイメージング能、DachPtおよびGd-DTPAのがん集積性を評価し、同モデルにおいて制がん剤の治療効果をMRIイメージングで追跡するTheranostic Nanomedicineの概念を実証する実験を行った。

A. 研究目的

がん組織に選択的に集積し、がんのMRI診断に広く利用できるMRI造影剤が望まれているが、そのような造影剤は未だ開発されていないのが現状である。また、がん化学療法においては、その有効性を的確に把握する必要があり、その目的においてMRIは有効な手段であると考えられる。そこで本研究では、研究代表者である西山が過去に開発を行い、現在、第一相臨床試験中のオキサリプラチン活性体(DachPt)を内包する高分子ミセルに、MRI造影剤のGd-DTPAを搭載し、DachPtによる治療効果をMRIによって追跡できる診断-治療機能一体型DDSを開発することを目指している(図1)。近年、Gdのデリバリーの為のDDSが活発に開発されているが、固形がんの選択的造影に成功した例は数少なく、すべてのシステムにおいてGdがDDS担体に安定な共有結合で導入されている為、Gdの蓄積毒性が問題となるが、本研究では、Gd-DTPAとDachPtが可逆的な錯体を形成することを利用している為、Gd-DTPAがDDS担体から最終的には放出され、安全性面において極めて優れている。さらに、本システムは、EPR効果によってがん組織での長期滞留が期待でき、術中MRIにおける位置把握精度向上のための強力なツールとなりうる。

前年度までの研究においては、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの調製法を確立し、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルはマウス大腸がんモデルマウスにおいて効果的にがん組織に集積することによって、優れた制がん

活性とがん組織特異的なMRIコントラストの増強を示すことが確認された。そこで3年計画の2年目にあたる平成22年度は、研究分担者であるCabralがDachPt/Gd-DTPA内包ミセルにおけるGd-DTPAの結合形態の解明を行う一方で、研究代表者である西山は、膵臓がん同所移植モデルにおけるMRIイメージング能、DachPtおよびGd-DTPAのがん集積性を評価し、同モデルにおいて制がん剤の治療効果をMRIイメージングで追跡するTheranostic Nanomedicineの概念を実証する実験を行った。

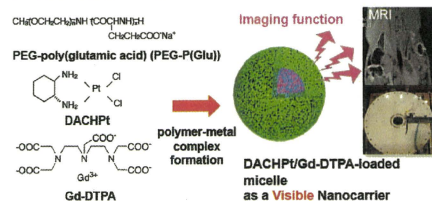


図1. 診断-治療機能一体型DDSとしてのDachPt/Gd-DTPA内包ミセル

B. 研究方法

1. 膵臓がん同所移植モデルにおけるMRIイメージング

ヒト膵臓がんBxPC3細胞をBALB/cヌードマウス(♀, 6週齢)の膵臓の皮下に直接注入することによって膵臓がん同所移植モデルマウスを作製した。このマウスに対して、5μmol/kgのGd-DTPAおよび

DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与し、4.7-T UNITY INOVA imaging spectrometer (Varian, Inc.)によってマウスの腹腔部のMRイメージングを行った。MRイメージングに関しては、ファントムをリファレンスとして投与から10分毎に4時間までの画像を取得した。

## 2. がん組織におけるGdおよびPtの集積性の評価

上述の膵臓がん同所移植モデルに対してPt換算で3mg/kgのDachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与し、4時間後の凍結切片のSpring-8を用いた蛍光X線分析( $\mu$ -SR-XRF)を行った。

## 3. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを用いた膵臓がん同所移植モデルに対する制がん活性のMRIによる追跡

上述の膵臓がん同所移植モデルに対して、Pt換算で8mg/kg、Gd換算で3mg/kgのDachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与し、投与2時間後のMRIを7.0-T MRI scanner (magnet: Kobelco and Jastec; console: Bruker Biospin)によって撮像した。コントロールとしては、30mg/kgのGd-DTPAを投与し、投与30分後にMRI撮像を行った。薬剤の投与とMRI撮像は、0, 4, 8, 11, 18日目に行い、計算式に基づいて算出した腫瘍の体積をMRIによって追跡した。18日目にマウスを犠牲死させ、摘出した膵臓がんの大きさを目視により確認した。

## C. 研究結果

### 1. 膵臓がん同所移植モデルにおけるMRイメージング

本研究において用いたヒト膵臓がんBxPC3細胞の同所移植モデルと組織切片のH&E染色の結果を図1に示した。この結果より、本モデルは実際の膵臓がんと同様に間質が豊富な腫瘍であることが示唆された。この膵臓がんモデルに対してGd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与した後のMRIを図2に示した。また、腫瘍および各臓器における $T_1$ 信号強度の変化を測定した結果を図3に示した。図2, 3より、Gd-DTPAの投与ではMRIシグナルの増大は確認されなかったが、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの投与によって腫瘍特異的に信号強度が増大することが確認された。

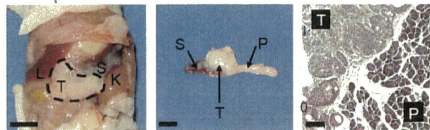


図1. ヒト膵臓がんBxPC3細胞の同所移植モデルとがん組織のH&E染色(T:がん; P:膵臓; S:膵臓; L:肝臓; K:腎臓)

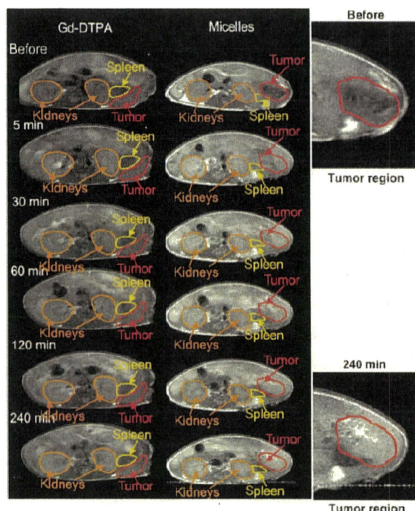


図2. Gd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセルによる膵臓がん同所移植モデルのMRイメージング

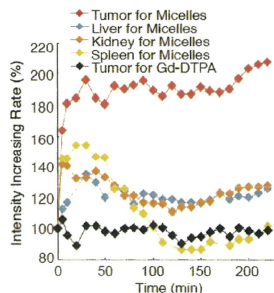


図3. Gd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセル投与後の腫瘍および各臓器における $T_1$ 信号強度の変化

## 2. がん組織におけるGdおよびPtの集積性の評価

膵臓がん同所移植モデルの凍結切片の $\mu$ -SR-XRFによって得られたK、Fe、Gd、Ptの元素マッピングの結果を図4に示した。ここで、Kはがん細胞で活性が亢進しているpyruvate kinaseのco-factorであり、その分布はがん細胞の分布を反映している。Feは、ヘム鉄によるものであり、その分布は血流の分布を反映している。これらを考慮すると、図4では、GdとPtはどちらもがん組織に対して選択的に集積していることが分かる。さらに蛍光標識DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを用いて凍結切片の蛍光観察を行ったところ、がん組織に選択的に蛍光が確認された(data not shown)。以上の結果より、膵臓がんの同所移植モデルにおいて

もDachPt/Gd-DTPA内包ミセルはがん組織に対して選択的に集積することが示唆された。

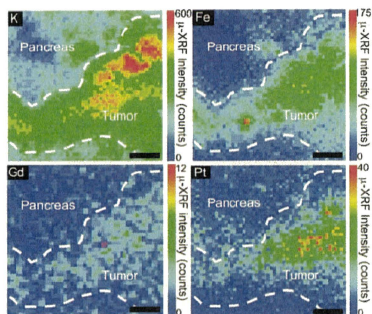


図4. ヒト膵臓がんBxPC3細胞の同所移植モデルとがん組織のH&E染色 (T:がん; P:膵臓; S:脾臓; L:肝臓; K:腎臓)

3. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを用いた膵臓がん同所移植モデルに対する制がん活性のMRIによる追跡

Theranostic Nanomedicineの概念を実証するために、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを用いて膵臓がん同所移植モデルに対して制がん剤(DACHPt)による治療効果をMRIにより追跡した(図5)。

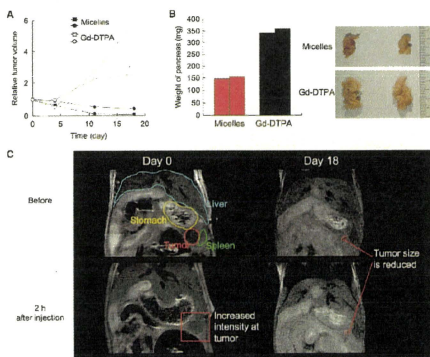


図5. A) DachPt/Gd-DTPA内包ミセル投与後の腫瘍体積の変化; B) 18日後の摘出腫瘍の重量と肉眼像; C) 0日後、18日後のGd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセル投与後のMRI画像

本実験の結果、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルは、BxPC3の同所移植モデルに対しても有効であり(図5A)、腫瘍の増殖抑制効果をMRIによって追跡することが可能であった(図5C)。この効果は、摘出した膵臓の肉眼所見ならびに重量の測定によっても

確認された(図5B)。

#### D. 考察

前年度までの研究において、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの調製法を確立し、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルはマウス大腸がんモデルマウスにおいて効果的にがん組織に集積することによって、優れた制がん活性とがん組織特異的なMRIコントラストの増強を示すことが確認された。そこで本年度は、研究分担者であるCabralがDachPt/Gd-DTPA内包ミセルにおけるGd-DTPAの結合形態の解明を行う一方で、研究代表者である西山は、膵臓がん同所移植モデルにおけるMRイメージング能を評価した。その結果、Gd-DTPAの投与ではMRIシグナルの増大は確認されなかったが、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの投与によって腫瘍特異的に信号強度が増大することが確認された(図2,3)。ここで、腫瘍部位の検知が容易な皮下腫瘍ではなく、他臓器によるMRI信号のために検知が困難な同所移植がんのMRイメージングに成功したことは極めて重要である。特に、膵臓がんは、血管密度が疎らであり、間質が豊富であるために増感剤の集積性が著しく低下しており、早期発見が極めて困難であることが知られている。本実験では、実際の膵臓がんと同様な組織構築を有するBxPC3腫瘍に対して[*M. R. Kano et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104 (9) 3460-3465 (2007)*], DachPt/Gd-DTPA内包ミセルが効果的に集積し(図4)、腫瘍のMRイメージングを可能にすることを示すものであり、難治性の膵臓がんの診断・治療に革新をもたらす成果として期待される。一方、本研究では、制がん剤(DACHPt)による治療効果をMRIにより追跡する実験を行った結果、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルは、BxPC3の同所移植モデルに対しても有効であり、腫瘍の増殖抑制効果をMRIによって追跡することが可能であることが示された(図5)。以上のように、本研究では、近年大きな注目を集めているTheranostic Nanomedicineの概念を難治性の膵臓がんモデルを用いて実証することができた。この成果は、2010年にCancer Research誌(S. Kaida, H. Cabral, N. Nishiyama et al. *Cancer Res.* 70 (18) 7031-7041 (2010))に掲載され、関連分野に大きなインパクトを与えるものと考えられる。

#### E. 結論

本年度は、前年度までに開発したDachPt/Gd-DTPA内包ミセルに関して、膵臓がん同所移植モデルにおけるMRイメージング能、DachPtおよびGd-DTPAのがん集積性を評価し、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルのがん組織への集積性の向上とMRIにおける腫瘍特異的なコントラストの増強を確認することができた。さらに、膵臓がん同所移植モデルに

において制がん剤の治療効果をMRイメージングで追跡する実験を行い、Theranostic Nanomedicineの概念を実証することができた。これらの成果は、早期発見が困難であり、難治性である膵臓がんの診断・治療に革新をもたらすものと期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. T. Nomoto, Y. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, S. Fukushima, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy. *J. Control. Release*, in press
2. F. Pittella, M. Zhang, Y. Lee, H. -J. Kim, T. Tockary, K. Osada, T. Ishii, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials* 32 (11) 3106-3114 (2011)
3. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release* 149 (1) 51-57 (2011)
4. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, K. Kataoka\*, Improved drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
5. M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles prepared from  $\alpha$ -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials* 32 (2) 652-663 (2011)
6. Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal microvideography. *Biomed. Opt. Express* 1 (4) 1209-1216 (2010)

7. S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res.* 70 (18) 7031-7041 (2010)
8. M. Kumagai, T. K. Sarma, H. Cabral, S. Kaida, M. Sekino, N. Herlambang, K. Osada, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced In vivo magnetic resonance imaging of tumors by PEGylated iron oxide-gold core-shell nanoparticles with prolonged blood circulation properties. *Macromol. Rapid Commun.* 31 (17) 1521-1528 (2010)
9. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.* 7 (2) 501-509 (2010)
10. Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka, Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (14) 2552-2555 (2010)
2. 学会発表
  1. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 松本有, 片岡一則, “細胞内環境に応答する白金錯体制がん剤内包高分子ミセルの創製”, 第 29 回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 神奈川 2010 年 5 月 27 日(口頭)
  2. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 松本有, 片岡一則, “高分子ミセルを利用した細胞内薬物分布の時空間制御に基づく耐性がんの克服”, 第 26 回日本 DDS 学会, 大阪国際交流センター, 大阪 2010 年 6 月 18 日(口頭)
  3. 西山伸宏, “難治がん治療のための高分子ミセル型 DDS の開発”, 第 29 回分子病理学研究会, 筑波大学総合研究棟 D 棟, 茨城 2010 年 7 月 31 日-8 月 1 日(招待講演)
  4. N. Nishiyama, H. Cabral, K. Kataoka, “Development of smart polymeric micelles for innovative cancer therapy”, World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Lisbon, Portugal, September 1, 2010 (Invited Lecture)
  5. N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Kataoka, “Nanocarrier-mediated photodynamic diagnosis and therapy of malignant tumors”, 4<sup>th</sup> Annual Symposium on Nanobiotechnology (October 5-7, 2010) “New Directions In Nanotheranostics: Imaging, Biosensors,

Materials and DNA Technologies”, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany, October 6, 2010 (Invited Lecture)

6. 西山伸宏, 守本祐司, 片岡一則, "高分子ミセル型 DDS と光照射システムの融合による革新的 PDT", 第 31 回日本レーザー医学会総会, ウィンクあいち, 愛知 2010 年 11 月 13 日 (招待講演)
7. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 呉寿栄, 松本有, 片岡一則, "オキサリプラチン耐性克服のための細胞内環境応答型高分子ミセルの開発", 第 32 回日本バイオマテリアル学会, グランドプリンスホテル広島, 広島 2010 年 11 月 30 日 (口頭)
8. N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Kataoka, "Polymeric micelles for photodynamic diagnosis and therapy", The 15th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Sheraton Hotel, Salt Lake City, Utah, USA, February 13-16, 2011 (Oral)

#### 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（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

固形がんの標的治療とその治療効果のMRIによる追跡を可能にする  
診断-治療機能一体型DDSの創製  
(DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルの調製と物性評価)

分担研究者 Cabral Horacio 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻  
特任講師

研究要旨

本研究では、現在臨床治験中のDACHPt内包ミセルにMRI造影剤のGd-DTPAを搭載することによって、DACHPtによる治療効果をMRIによって追跡できる診断-機能一体型DDSの開発を行っている。本年度は、前年度までに調製法を確立したDACHPt/Gd-DTPA内包ミセルにおいて、ミセル内核におけるGd-DTPAの結合様式の解明を行なった。

A. 研究目的

MRIは、がんの非侵襲的診断法として極めて重要であるが、精度向上の為にMRI造影剤の開発が重要である。これまでにGd-DTPA(マグネシウム)および磁性微粒子がそれぞれ脳腫瘍および肝がんの画像診断に利用されているが、前者では脳腫瘍で血液-脳関門が一部破綻していること、後者では微粒子が肝臓のクッパー細胞に貪食されることを利用しており、上記以外の固形がんのMRI診断に応用することが困難である。従って、がん組織に選択的に集積し、がんのMRI診断に広く利用できるMRI造影剤が望まれているが、そのような造影剤は未だ開発されていないのが現状である。一方、我々は、高分子ミセルを利用したDDSの開発に従事し、オキサリプラチン活性体(DACHPt)等の金属錯体を内包したミセルの開発に世界で初めて成功した。我々は、白金制がん剤を内包したミセルが、血中を長期滞留し、腫瘍血管の透過性亢進と未発達なリンパ系に起因するEnhanced Permeability and Retention (EPR)効果によって固形がんへの選択的集積と高い治療効果を示すことを明らかにしており、それらのミセルは現在、臨床治験中である。そこで本研究では、Gd-DTPAが有する遊離カルギキシル基が白金と可逆的な金属錯体を形成することに着目し、Gd-DTPAとDACHPtを同時に内包した高分子ミセルを構築し、上記以外の大腸がんや膵がん等に対するDACHPtのデリバリーによるがん標的治療とGd-DTPAのデリバリーによる制がん効果の追跡を可能にする世界初の診断-治療一体型DDSの開発を目指している。

本分担研究では、前年度までに調製法を確立したDACHPt/Gd-DTPA内包ミセルにおいて、ミセル内核におけるGd-DTPAの結合様式の解明を行なった。

B. 研究方法

1. DACHPtとGd-DTPAの混合溶液のパルスNMR測定

*bis*(nitrate)(*trans*-1-1,2-diaminocyclohexane) platinum(II) (DACHPt)とGd-DTPAの結合を評価するために異なるモル比(DACHPt/Gd-DTPA ratio)でDACHPt/Gd-DTPA混合溶液を調製し、パルスNMRを用いたファントム実験によりT<sub>1</sub>緩和能を測定した。T<sub>1</sub>緩和能( $r_1$ )は以下の式より算出した。

$$1/T_1 = 1/T_{10} + r_1 [Gd]$$

T<sub>1</sub>: スピン-格子緩和時間(縦緩和時間)

2. DACHPtとGd-DTPAの混合溶液におけるGd<sup>3+</sup>イオンの定量

DACHPtとGd-DTPAの混合溶液におけるGd<sup>3+</sup>イオンの定量をArsenazo III colorimetric assay (Bioconjugate Chem. 12: 372-377(2001))によって行った。GdCl<sub>3</sub>を用いて検量線を作成し、Arsenazo III /Gd<sup>3+</sup>コンプレックスの660nmにおける吸光度を測定した。

3. DACHPt/Gd-DTPA混合溶液のフーリエ変換赤外吸収スペクトル(FT-IR)測定  
Gd-DTPA、DACHPtならびにDACHPt/Gd-DTPA

混合溶液(DACHPt:Gd-DTPA 仕込み比=1:1, 1:5, 1:10)の凍結乾燥サンプルをKBrを用いてペレット化し、フーリエ変換赤外吸収スペクトル装置(FT-IR, FT/IR 615, JASCO)を用いて $1650\text{cm}^{-1}$ のPt-COO結合に由来するIRスペクトルを測定した。

## C. 研究結果

### 1. DACHPtとGd-DTPAの混合溶液のパルスNMR測定

異なるモル比(DACHPt/Gd-DTPA ratio)で調製したDACHPt/Gd-DTPA混合溶液の $T_1$ 緩和能( $r_1$ )の測定結果を図1に示す。

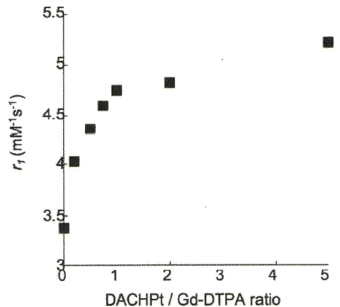


図1. DACHPtとGd-DTPAの混合溶液の $r_1$ 値

図1に示すように、DACHPt/Gd-DTPA ratioが増大することによってDACHPt/Gd-DTPA混合溶液の $r_1$ 値が増大し、DACHPt/Gd-DTPA ratio=1でほぼ一定となった。 $r_1$ 値増大のメカニズムは未だ不明であるが、この結果はDACHPtとGd-DTPAが1:1の錯体を形成していることを示唆するものと考えられる。ここで、DACHPtの代わりにoxalatoを配位子として有するoxaliplatinとGd-DTPAの混合溶液のパルスNMR測定を行なったところ、 $r_1$ 値に変化は見られなかった(data not shown)。この結果より、カルボキシル基でキレート安定化されたoxaliplatinはGd-DTPAとは錯体を形成しないものと思われた。

### 2. DACHPtとGd-DTPAの混合溶液におけるGd<sup>3+</sup>イオンの定量

検量線を作成するためにArsenazo III/Gd<sup>3+</sup>コンプレックスの吸収スペクトルを測定した(図2A)。その結果、Gd<sup>3+</sup>の濃度依存的に660nmにおける吸光度が増大することが確認された。次に、Gd-DTPA および DACHPt/Gd-DTPA 混合溶液(DACHPt/Gd-DTPA ratio=1)のArsenazo IIIと混合した後の吸収スペクトルを測定した(図2B)。その結果、Gd-DTPAおよびDACHPt/Gd-DTPA混合溶液のどちらにおいてもフリーのGd<sup>3+</sup>イオンは存在しないことが確認された。

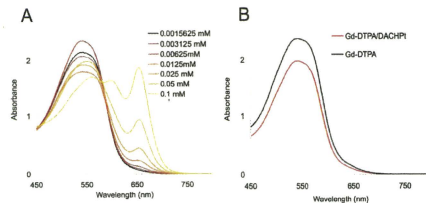


図2. A) GdCl<sub>3</sub>とArsenazo IIIの反応により得られた吸収スペクトル(検量線); B) Gd-DTPAおよびDACHPt/Gd-DTPA 混合溶液(DACHPt/Gd-DTPA ratio=1)とArsenazo IIIの反応後の吸収スペクトル

### 3. DACHPt/Gd-DTPA混合溶液のフーリエ変換赤外吸収スペクトル(FT-IR)測定

Gd-DTPA、DACHPtならびにDACHPt/Gd-DTPA混合溶液(DACHPt:Gd-DTPA 仕込み比=1:1, 1:5, 1:10)の凍結乾燥サンプルのFT-IRスペクトルの測定結果を図3に示す。

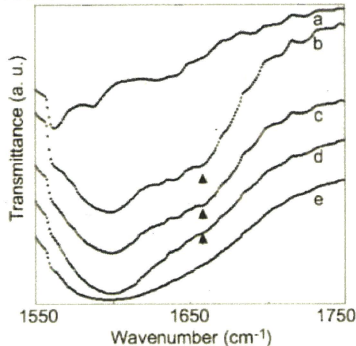


図3. DACHPt(a)、DACHPt/Gd-DTPA 混合溶液(DACHPt:Gd-DTPA 仕込み比=1:1(b), 1:5(c), 1:10(d))、Gd-DTPA(e)のFT-IRスペクトル

図3に示したように、DACHPt/Gd-DTPA混合溶液においてPt-COO結合に由来する $1650\text{cm}^{-1}$ の吸収が確認された。以上の結果より、DACHPtとGd-DTPAはPt-COO結合を介して錯体を形成しているものと考えられた。

## D. 考察

前年度までに、制がん剤DACHPtとMRI造影剤Gd-DTPAを同時に搭載したDACHPt/Gd-DTPA内包ミセルの調製法を確立し、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルはGd-DTPAの24倍の $T_1$ 緩和能( $r_1$ )を有することが確認された。さらに、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルは、水中ではミセルは非常に安定であるが、生体内のCl<sup>-</sup>イオン濃度においてPtのカルボキシレートからクロロへの配位子交換反応によりDACHPt

とGd-DTPAがミセルから徐放されることが明らかになった。そこで本年度は、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルの形成メカニズムを解明するためにDACHPtとGd-DTPAの相互作用の解明に焦点を当てて研究を行った。第一に、DACHPt/Gd-DTPA混合溶液の Pulsed NMR測定においては、DACHPtとGd-DTPAが1:1の錯体を形成することが確認された(図1)。ここで、oxaliplatinとGd-DTPAの混合溶液の Pulsed NMR測定では $r_1$ 値に変化は見られなかったことから、DACHPtがGd-DTPAのカルボキシル基に配位することによって $r_1$ 値の大きな錯体を形成しているものと考えられた。そこで、DACHPt/Gd-DTPA混合溶液のFT-IR測定を行った結果、Pt-COO結合に由来する $1650\text{cm}^{-1}$ の吸収が確認された(図3)。以上の結果より、DACHPtとGd-DTPAはPt-COO結合を介して錯体を形成しているものと考えられた。さらに、DACHPtとGd-DTPAの錯体形成におけるフリーの $\text{Gd}^{3+}$ イオンの放出をArsenazo III colorimetric assayによって評価したところ、 $\text{Gd}^{3+}$ イオンは放出されていないことが明らかになった(図2)。この結果は、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルにおいて、GdをDTPA錯体のままで内包できることを示唆しており、毒性の強い $\text{Gd}^{3+}$ イオンが放出されないことはMRI造影剤として重要であると考えられる。

#### E. 結論

本分担研究では、前年度までに調製法を確立したDACHPt/Gd-DTPA内包ミセルにおいて、ミセル内核におけるGd-DTPAの結合様式の解明に焦点を当てた研究を行った。その結果、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルでは、内核において、 $\text{Gd}^{3+}$ イオンを放出させることなく、Pt-COO結合を介してGd-DTPAをミセル内核に封入できることが示唆された。さらに、ミセル内核では、 $r_1$ 値の大きなGd錯体が形成されていることも示唆された。これらの結果は、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルを治療-診断一体化システムとして更なる応用を展開していくために重要な特性であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, K. Kataoka, Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
- Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K.

Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography. *Biomed. Opt. Express* 1 (4) 1209-1216 (2010)

- S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res.* 70 (18) 7031-7041 (2010)
- M. Kumagai, T. K. Sarma, H. Cabral, S. Kaida, M. Sekino, N. Herlambang, K. Osada, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced in vivo Magnetic Resonance Imaging of Tumors by PEGylated Iron Oxide-Gold Core-Shell Nanoparticles with Prolonged Blood Circulation Properties. *Macromol. Rapid Commun.* 31 (17) 1521-1528 (2010)

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
Y. Lee, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles.	Angew. Chem. Int. Ed.	49	2552-2555	2010
M. Oba, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1.	Mol. Pharm.	7	501-509	2010
M. Kumagai, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Enhanced In vivo magnetic resonance imaging of tumors by PEGylated iron oxide-gold core-shell nanoparticles with prolonged blood circulation properties.	Macromol. Rapid Commun.	31	1521-1528	2010
S. Kaida, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model.	Cancer Res.	70	7031-7041	2010
Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography.	Biomed. Opt. Express	1	1209-1216	2010
M. Oba, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka et al.	Polyplex micelles prepared from $\omega$ -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery.	Biomaterials	32	652-663	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Murakami, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting.	Science Transl. Med.	3	64ra2	2011
Y. Vachutinsky, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles.	J. Control. Release	149	51-57	2011
F. Pittella, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity.	Biomaterials	32	3106-3114	2011

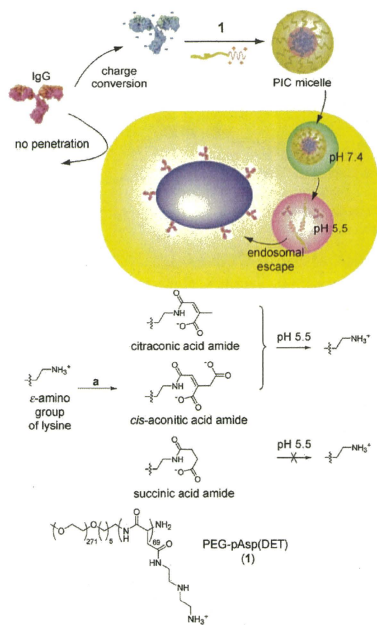
# Efficient Delivery of Bioactive Antibodies into the Cytoplasm of Living Cells by Charge-Conversional Polyion Complex Micelles\*\*

Yan Lee, Takehiko Ishii, Hyun Jin Kim, Nobuhiro Nishiyama, Yoshiyuki Hayakawa, Keiji Itaka, and Kazunori Kataoka\*

Antibodies are the most important component of humoral immunity, and can recognize and deactivate their corresponding extracellular antigens with outstanding selectivity. Moreover, the development of monoclonal and humanized antibodies has contributed greatly to the recent success of antibodies as biopharmaceuticals.<sup>[1]</sup> However, the target of such antibodies is limited to the cell exterior because of the lack of a delivery system of antibodies into the interior of the cell. Although the detection or inactivation of an intracellular protein was partially accomplished by the intracellular expression of antibodies,<sup>[2]</sup> the development of an efficient and safe delivery method of an antibody into living cells is required for further advances in therapeutics and bioanalysis. Various methods, such as microinjection, liposomes, cell-penetrating peptides, and even recombinant viruses, have been introduced,<sup>[3]</sup> however, their general use is often limited because of the need for highly specialized devices, as well as the complexity and inefficiency of these methods.

We recently developed a novel protein-delivery system into cytoplasm based on charge-conversional polyion complex (PIC) micelles.<sup>[4]</sup> The charge density of a model protein, cytochrome *c*, can be temporarily increased by the modification of the  $\epsilon$ -amines of lysine residues into charge-conversional moieties, citraconic acid amide (Cit) or *cis*-aconitic acid amide (Aco) (Figure 1). As the positively charged lysines convert to the negatively charged carboxylic groups by this modification, the modified proteins become strongly anionic and the resulting charge density can be increased significantly

to form stable PIC micelles with cationic block copolymers even at physiological salt concentrations. The charge-converted proteins and the cationic block in the copolymer form the core of the PIC micelle, and the polyethylene glycol (PEG) block forms the surface shell. After the PIC micelles were internalized to cells, the Cit and Aco rapidly degraded to reproduce the original lysines at the endosomal pH of 5.5.<sup>[4]</sup> The dissociation of the PIC micelles follows the regeneration of the original protein to release the free cationic block copolymer, which induces the pH-dependent destabilization



**Figure 1.** Preparation of the charge-conversional PIC micelles between IgG derivatives and PEG-pAsp(DET). a) Citraconic anhydride, *cis*-aconitic anhydride, or succinic anhydride. IgG = immunoglobulin G, PEG-pAsp(DET) = PEG-poly[N-(N'-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl)aspartamide].

[\*] Dr. T. Ishii, Prof. Dr. K. Kataoka  
Department of Bioengineering, The University of Tokyo  
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656 (Japan)  
Fax: (+81) 3-5841-7139  
E-mail: kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

Dr. Y. Lee  
Department of Chemistry, Seoul National University  
Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742 (Korea)

H. J. Kim, Y. Hayakawa, Prof. Dr. K. Kataoka  
Department of Materials Engineering  
The University of Tokyo (Japan)

Dr. N. Nishiyama, Dr. K. Itaka, Prof. Dr. K. Kataoka  
Center for Disease Biology and Integrative Medicine  
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo (Japan)

Dr. N. Nishiyama, Dr. K. Itaka, Prof. Dr. K. Kataoka  
Center for Nanobio Integration, The University of Tokyo (Japan)

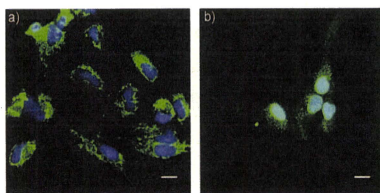
[\*\*] This work was supported by a Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) grant from the Japan Science and Technology Agency (JST).

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200905264>.

of the endosomal membrane to aid the endosomal escape of the protein into cytoplasm.<sup>[6]</sup>

In the present study, we applied the same concept to intracellular antibody delivery for the purpose of controlling a cell pathway. As the molecular weight of the PIC micelle is well over several megadaltons,<sup>[7]</sup> we expected that the charge-conversional PIC micelle could easily deliver full immunoglobulin G (IgG) molecules with a molecular weight of 150 kD, which are difficult to deliver into the cytoplasm of living cells.

First, we examined the change in bioselectivity after the charge-conversional modification of IgG by using fixed and permeated cells in which the plasma membrane is no longer a penetration barrier of antibodies. All experimental procedures are described in detail in the Supporting Information. The nuclear pore complex (NPC), which is a protein complex that controls the transport of biomolecules across the nuclear envelope, was selected as a target for the antibodies.<sup>[8]</sup> Although anti-NPC mouse IgG can recognize the NPC of fixed cells selectively (Supporting Information, Figure S1a), anti-NPC IgG modified with Cit (anti-NPC IgG-Cit) loses this selectivity (Supporting Information, Figure S1b). However, the selectivity of anti-NPC IgG-Cit is mostly recovered after incubation at pH 5.5 (Figure 2b), contrary to the result after



**Figure 2.** Recognition of NPC in fixed human hepatoma (HuH-7) cells by anti-NPC IgG-Cit after 4 h of incubation at a) pH 7.4 and b) pH 5.5. Anti-NPC IgG-Cit was applied to the cells after fixation. The cell nuclei were stained by Hoechst 33258 (blue), and the anti-NPC IgG-Cit was detected by a secondary antibody, the Alexa Fluor 488-labeled (Fab')<sub>2</sub> fragment from goat anti-mouse IgG (green). Scale bars: 20 μm. Fab = fragment, antigen-binding.

incubation at pH 7.4 (Figure 2a). The rapid degradation of Cit at pH 5.5 allowed regeneration of the selectivity of anti-NPC IgG. The selectivity change of the other derivatives, anti-NPC IgG modified with Aco (anti-NPC IgG-Aco) and anti-NPC IgG modified with a nondegradable succinic acid amide (anti-NPC IgG-Suc), is shown in Figure S1 in the Supporting Information. As expected, nondegradable anti-NPC IgG-Suc showed no selectivity after incubation at either pH 7.4 or pH 5.5.

For the formation of PIC micelles, we selected PEG-poly[N-(N'-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl)aspartamide] (PEG-pAsp(DET); **1**) as a cationic block copolymer. Compound **1** shows efficient cytoplasmic delivery of DNA and proteins with minimal cytotoxicity,<sup>[9]</sup> and thus we expected that the PIC micelles based on **1** would also be able to deliver

IgG into cytoplasm efficiently. The formation of PIC micelles between the modified anti-NPC IgG derivatives and **1** was examined by dynamic light scattering (DLS; Table 1).

**Table 1:** Formation of PIC micelles containing IgG derivatives.

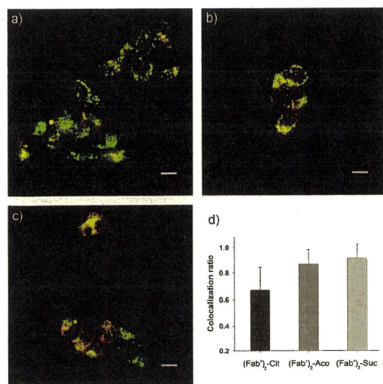
IgG derivative	Diameter [nm] <sup>[a]</sup>	PD <sup>[b,c]</sup>
anti-NPC IgG	N.D. <sup>[c]</sup>	N.D.
anti-NPC IgG-Cit	98.3	0.096
anti-NPC IgG-Aco	107	0.016
anti-NPC IgG-Suc	111	0.121

[a] Determined by DLS. [b] Polydispersity index. [c] Not determined.

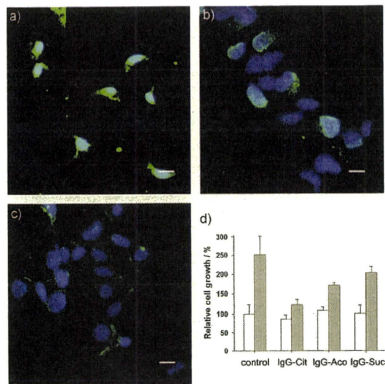
Although the native anti-NPC IgG could not form the PIC micelles with **1**, anti-NPC IgG derivatives with increased charge densities were able to form PIC micelles successfully, even at physiological salt concentrations (150 mM NaCl). All PIC micelles showed unimodal size distributions (Supporting Information, Figure S2) with hydrodynamic diameters of around 100 nm.

The pH-dependent dissociation of the charge-conversional PIC micelles containing the antibody derivatives was confirmed by the fluorescence quenching/dequenching method.<sup>[10]</sup> Herein, we used Alexa Fluor 488-labeled IgG (Fab')<sub>2</sub> fragments from goat anti-mouse IgG as a payload in the PIC micelles instead of whole IgG molecules to chase the green fluorescence. The fluorescence intensity of the IgG (Fab')<sub>2</sub> derivatives in the core of the PIC micelles was reduced significantly as a result of the probe-probe quenching effect (20–30%). The decreased fluorescence intensity could be recovered after the release of the IgG (Fab')<sub>2</sub> from the PIC micelles (Supporting Information, Figure S4). Although the PIC micelles containing IgG (Fab')<sub>2</sub>-Cit or IgG (Fab')<sub>2</sub>-Aco were stable at pH 7.4, they dissociated rapidly at pH 5.5. The decrease of the charge density in IgG (Fab')<sub>2</sub> derivatives resulting from the pH-sensitive degradation of Cit and Aco is likely to be the main reason for this destabilization.

Next, we examined the intracellular trafficking of the charge-conversional antibodies on the living cells without fixation or permeation. Because the encapsulated IgG (Fab')<sub>2</sub> derivatives were labeled with Alexa Fluor 488 (green) and the late endosomes and lysosomes were stained with LysoTracker Red (red), the IgG (Fab')<sub>2</sub> in the endosome showed yellow fluorescence as a result of the co-localization of green and red fluorescence. The IgG (Fab')<sub>2</sub> was detected as green only after endosomal escape. IgG (Fab')<sub>2</sub>-Cit showed efficient endosomal escape (Figure 3a), whereas IgG (Fab')<sub>2</sub>-Aco and IgG (Fab')<sub>2</sub>-Suc showed limited endosomal escape (Figure 3b,c). The degrees of endosomal escape are summarized in Figure 3d as a co-localization ratio between the green and red fluorescence; the lower the co-localization ratio, the more efficient the endosomal escape. The most efficient endosomal escape of the Cit derivative corresponds to our previous result.<sup>[4b]</sup> Because pH-sensitive protonation and direct contact with the endosomal membrane of the pAsp(DET) block are essential for endosomal destabilization,<sup>[11]</sup> the lowest endosomal escape of the nondissociable IgG (Fab')<sub>2</sub>-Suc PIC micelle is reasonable.



**Figure 3.** Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of HuH-7 cells treated with PIC micelles containing Alexa Fluor 488-labeled IgG (Fab')<sub>2</sub> fragment derivatives (green). a) (Fab')<sub>2</sub>-Cit, b) (Fab')<sub>2</sub>-Aco, and c) (Fab')<sub>2</sub>-Suc. The late endosomes and lysosomes were stained with LysoTracker Red. Scale bars: 20 μm. d) Colocalization of the green fluorescence of (Fab')<sub>2</sub> derivatives and the red fluorescence of LysoTracker Red. Error bars: standard deviation.



**Figure 4.** CLSM images of HuH-7 cells treated with PIC micelles containing a) anti-NPC IgG-Cit, b) anti-NPC IgG-Aco, and c) anti-NPC IgG-Suc. The cell nuclei were stained by Hoechst 33258 (blue), and the IgG derivatives were detected by a secondary antibody, the Alexa Fluor 488-labeled (Fab')<sub>2</sub> fragment from goat anti-mouse IgG (green). Scale bars: 20 μm. d) Growth of HuH-7 cells treated by each type of PIC micelle. White and gray bars represent the relative cell growth after 24 and 48 h of incubation, respectively. Error bars: standard deviation.

Finally, we examined the recognition of the NPC by the intracellular delivery of anti-NPC IgG into living cells by PIC micelles. The intracellular distribution of anti-NPC IgG released from the micelles was visualized by treating the cells with a secondary antibody, the Alexa Fluor 488-labeled (Fab')<sub>2</sub> fragment from goat anti-mouse IgG (green), after fixation. Note that the IgG derivative segregated in the core of PIC micelles may not be detected by this procedure; however, the released IgG can be selectively visualized in the cell. Anti-NPC IgG-Cit showed excellent recognition activity of NPC compared to the other IgG derivatives. The strong aquamarine fluorescence from the co-localization of the anti-NPC IgG (green) and the nucleus (blue) clearly represents NPC recognition by the anti-NPC IgG released from the anti-NPC IgG-Cit PIC micelles (Figure 4a). Anti-NPC IgG-Aco also recognized the NPC, but the intensity of its green fluorescence was lower than that of anti-NPC IgG-Cit, probably because of its limited endosomal escape efficiency (Figure 4b). The non-charge-conversional control, anti-NPC IgG-Suc, showed no selectivity on the nuclear envelope (Figure 4c).

The control of cell growth by the delivery of charge-conversional intracellular antibodies was confirmed by counting cell numbers (Figure 4d). As NPC controls the transport of essential biomolecules between the nucleoplasm and cytoplasm, the recognition and deactivation of NPC by anti-NPC IgG are critical for cell growth. Cells that were treated with anti-NPC IgG-Suc PIC micelles showed almost no change in cell growth, whereas those treated with anti-NPC IgG-Cit micelles showed a significant reduction in cell growth

( $P < 0.05$ ) after 48 h. The effect of the anti-NPC IgG-Aco PIC micelles was midway between those of anti-NPC IgG-Cit and anti-NPC IgG-Suc. A comparison with control data from a nonspecific IgG (IgG1 kappa) is shown in Figure S6 in the Supporting Information.

In summary, we have successfully delivered biologically active IgG into cytoplasm by the charge-conversional PIC micelle method for controlling cell growth. Considering that an antibody has outstanding selectivity on its corresponding antigen, the concept of charge-conversional intracellular antibody delivery reported here is expected to have high potential for the bioimaging of the intracellular structures and functions of living cells, as well as for biotherapeutics to target intracellular antigens. Moreover, charge-conversional PIC micelles could be used in intravenous protein delivery, based on the high biocompatibility and elongated circulation provided by the PEG shell of the PIC micelles. New therapeutic strategies with both specificity and efficiency may also be expected through the combination of an antibody-based ligand for the recognition of a specific extracellular antigen on the cell surface and the charge-conversional antibody for the deactivation of an intracellular antigen.

Received: September 21, 2009  
Published online: March 5, 2010

**Keywords:** antibodies · biological activity · charge conversion · drug delivery · micelles



- [1] a) G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, *256*, 495–497; b) M. J. Glennie, J. G. J. van de Winkel, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 503–510; c) R. A. Lerner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8284–8305; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8106–8125.
- [2] M. Stocks, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 359–365.
- [3] a) K. H. Antman, D. M. Livingston, *Cell* **1980**, *19*, 627–635; b) C. A. Lackey, O. W. Press, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 996–1001; c) M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1173–1176; d) B. Cornelissen, M. Hu, K. McLarty, R. M. Reilly, *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 37–46; e) Y. Kondo, K. Fushikida, T. Fujieda, K. Sakai, K. Miyata, F. Kato, M. Kato, *J. Immunol. Methods* **2008**, *332*, 10–17.
- [4] a) Y. Lee, S. Fukushima, Y. Bae, S. Hiki, T. Ishii, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5362–5363; b) Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H. J. Kim, J. H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, K. Kataoka, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5413–5416; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5309–5312.
- [5] a) J. K. Shetty, J. E. Kinsella, *Biochem. J.* **1980**, *191*, 269–272; b) Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5241–5244; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5163–5166.
- [6] K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16287–16294.
- [7] A. Harada, K. Kataoka, *Macromolecules* **1998**, *31*, 288–294.
- [8] K. J. Ryan, S. R. Wente, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 361–371.
- [9] a) N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W.-D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U.-I. Chung, K. Kataoka, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 439–444; b) K. Masago, K. Itaka, N. Nishiyama, U. Chung, K. Kataoka, *Biomaterials* **2007**, *28*, 5169–5175.
- [10] a) B. Z. Packard, A. Komoriya, D. D. Toptygin, L. Brand, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 5070–5074; b) Y. Lee, H. Mo, H. Koo, J.-Y. Park, M. Y. Cho, G. Jin, J.-S. Park, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 13–18.
- [11] S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6001–6009.

## Antiangiogenic Gene Therapy of Solid Tumor by Systemic Injection of Polyplex Micelles Loading Plasmid DNA Encoding Soluble Fit-1

Makoto Oba,<sup>†</sup> Yelena Vachutinsky,<sup>‡</sup> Kanjiro Miyata,<sup>§</sup> Mitsunobu R. Kano,<sup>||,†</sup>  
Sorato Ikeda,<sup>¶</sup> Nobuhiro Nishiyama,<sup>\*\*§</sup> Keiji Itaka,<sup>§</sup> Kohei Miyazono,<sup>||,†</sup>  
Hiroyuki Koyama,<sup>†</sup> and Kazunori Kataoka<sup>\*,†,§,||,¶</sup>

*Department of Clinical Vascular Regeneration, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8655, Japan, Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan, Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan, Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan, and Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan*

Received September 14, 2009; Revised Manuscript Received January 8, 2010; Accepted February 23, 2010

**Abstract:** In this study, a polyplex micelle was developed as a potential formulation for antiangiogenic gene therapy of subcutaneous pancreatic tumor model. Poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers (PEG-PLys) with thiol groups in the side chain of the PLys segment were synthesized and applied for preparation of disulfide cross-linked polyplex micelles through ion complexation with plasmid DNA (pDNA) encoding the soluble form of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 (sFit-1), which is a potent antiangiogenic molecule. Antitumor activity and gene expression of polyplex micelles with various cross-linking rates were evaluated in mice bearing subcutaneously xenografted BxPC3 cell line, derived from human pancreatic adenocarcinoma, and polyplex micelles with optimal cross-linking rate achieved effective suppression of tumor growth. Significant gene expression of this micelle was detected selectively in tumor tissue, and its antiangiogenic effect was confirmed by decreased vascular density inside the tumor. Therefore, the disulfide cross-linked polyplex micelle loading sFit-1 pDNA has a great potential for antiangiogenic therapy against subcutaneous pancreatic tumor model by systemic application.

**Keywords:** Polymeric micelle; block copolymer; antiangiogenic tumor gene therapy; sFit-1

### Introduction

Antiangiogenic tumor gene therapy is an intensively studied approach to inhibit tumor growth by destructing its

neo-vasculature formation.<sup>1,2</sup> Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a major proangiogenic molecule, which stimulates angiogenesis via promoting endothelial prolifera-

\* To whom correspondence should be addressed. K.K.: tel, +81-3-5841-7138; fax, +81-3-5841-7139; e-mail, kataoka@bmv.tu-tokyo.ac.jp; The University of Tokyo, Department of Materials Engineering, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan. N.N.: tel, +81-3-5841-1430; fax, +81-5841-7139; e-mail, nishiyama@bmv.t.u-tokyo.ac.jp.

† Department of Clinical Vascular Regeneration, Graduate School of Medicine.

‡ Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering.

§ Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine.

|| Center for NanoBio Integration.

¶ Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine.

\*\* Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering.

tion, survival, and migration. The soluble form of VEGF receptor-1 (fms-like tyrosine kinase-1: Flt-1) is a potent endogenous molecule, which can be used for antiangiogenic therapy.<sup>3,4</sup> The sFlt-1 binds to VEGF with the same affinity and equivalent specificity as that of the original receptor,<sup>5</sup> however it inhibits its signal transduction.

Gene therapy is becoming a promising strategy to supply consecutive expression of antiangiogenic proteins over a period of time. Indeed, a number of studies have already demonstrated the potential of therapeutic genes encoding angiogenic inhibitors to suppress tumor growth.<sup>6,7</sup> The major challenge in systemic gene therapy, however, is a need for a safe and effective vector system that can deliver the gene to the target tissue and cells with no detrimental side effects. In terms of safety, nonviral gene vectors are gaining popularity over viral vectors, however, their intracellular delivery and transfection potential require further optimization. Recently, several reports were published on *in vivo* nonviral gene therapy utilizing sFlt-1 for inhibition of tumor angiogenesis.<sup>8,9</sup>

Based on these criteria, cross-linked polyplex micelles were designed and prepared through electrostatic interaction of thiolated poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) (PEG-PLys) block copolymers and plasmid DNA (pDNA) encoding sFlt-

1. We have previously reported that disulfide cross-links introduced into the polyplex micelle core contribute to the stabilization of its structure in the extracellular entity while facilitating smooth release of the entrapped pDNA, in response to the reductive environment, inside the cells.<sup>10,11</sup> The outer hydrophilic shell layer, formed by PEG segment, increases complex stability in serum, avoiding nonspecific interactions with plasma proteins and reduces polymer toxicity.<sup>12</sup>

In this study, cross-linked polyplex micelles were systematically administered to mice bearing subcutaneously xenografted BxPC3 human pancreatic adenocarcinoma and evaluated for their transfection efficiency. Note that BxPC3 xenografts, as some intractable solid tumors, are characterized by stroma-rich histology,<sup>13</sup> which limits access of therapeutic agents to tumor cells. Thus, the accessibility of endothelial cells by bloodstream makes an antiangiogenic approach an attractive strategy against this model. Here we report a potent tumor growth inhibitory effect achieved by effective antiangiogenic ability by the polyplex micelles with an optimal cross-linking degree, which enables the selective expression of loaded sFlt-1 gene in tumor tissue.

## Experimental Section

**Materials.** pDNA for luciferase (Luc) with the pAcc vector having the CAG promoter was provided by RIKEN Gene Bank (Tsukuba, Japan) and amplified in competent DH5 $\alpha$  *Escherichia coli*, followed by purification using a NucleoBond Xtra Maxi (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and RPMI 1640 medium were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Madison, WI). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd. (Osaka, Japan). Alexa488- and Alexa647-conjugated secondary antibodies to rat IgG were obtained from Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR). Human soluble VEGF R1/

- Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182–1186.
- Quesada, A. R.; Munoz-Chapuli, R.; Medina, M. A. Antiangiogenic Drugs: from Bench to Clinical Trials. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26*, 483–530.
- Shibuya, M.; Yamaguchi, S.; Yamane, A.; Ikeda, T.; Tojo, A.; Matsushima, H.; Sato, M. Nucleotide Sequence and Expression of a Novel Human Receptor-type Tyrosine Kinase Gene (flt) Closely Related to the Fms Family. *Oncogene* **1990**, *5*, 519–524.
- Kendall, R. L.; Thomas, K. A. Inhibition of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Activity by an Endogenously Encoded Soluble Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 10705–10709.
- Kendall, R. L.; Wang, G.; Thomas, K. A. Identification of a Natural Soluble Form of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, FLT-1, and Its Heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *226*, 324–428.
- Kong, H. L.; Hecht, D.; Song, W.; Kovsedi, I.; Hackett, N. R.; Yayon, A.; Crystal, R. G. Regional Suppression of Tumor Growth by *In Vivo* Transfer of a cDNA Encoding a Secreted form of the Extracellular Domain of the Flt-1 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 823–833.
- Kuo, C. J.; Famebo, F.; Yu, E. Y.; Christofferson, R.; Swearingen, R. A.; Charter, R.; von Recum, H. A.; Yuan, J.; Kamihara, J.; Flynn, E.; D'Amato, R.; Folkman, J.; Mulligan, R. C. Comparative Evaluation of the Antitumor Activity of Antiangiogenic Proteins Delivered by Gene Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 4605–4610.
- Kim, W. J.; Yockman, J. W.; Jeong, J. H.; Christensen, L. V.; Lee, M.; Kim, Y. H.; Kim, S. W. Anti-angiogenic Inhibition of Tumor Growth by Systemic Delivery of PEI-g-PEG-RGD/pCMV-sFlt-1 Complexes in Tumor-bearing Mice. *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 381–388.
- Kommareddy, S.; Amiji, M. Antiangiogenic Gene Therapy with Systemically Administered sFlt-1 Plasmid DNA in Engineered Gelatin-based Nanovectors. *Cancer Gene Ther.* **2007**, *14*, 488–498.
- Miyata, K.; Kakizawa, Y.; Nishiyama, N.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Koyama, H.; Kataoka, K. Block Cationer Polyplexes with Regulated Densities of Charge and Disulfide Cross-linking Directed to Enhance Gene Expression. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2355–2361.
- Miyata, K.; Kakizawa, Y.; Nishiyama, N.; Yamasaki, Y.; Watanabe, T.; Kohara, M.; Kataoka, K. Freeze-dried Formulations for *In Vivo* Gene Delivery of PEGylated Polyplex Micelles with Disulfide Crosslinked Cores to the Liver. *J. Controlled Release* **2005**, *109*, 15–23.
- Itaka, K.; Yamauchi, H.; Harada, A.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. Polyion Complex Micelles from Plasmid DNA and Poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) Block Copolymer as Serum-tolerable Polyplex System: Physicochemical Properties of Micelles Relevant to Gene Transfection Efficiency. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4495–4506.
- Kano, M. R.; Bae, Y.; Iwata, K.; Morishita, Y.; Yashiro, M.; Oka, M.; Fujii, T.; Komuro, A.; Kiyono, K.; Kaminishi, M.; Hirakawa, K.; Ouchi, Y.; Nishiyama, N.; Kataoka, K.; Miyazono, K. Improvement of Cancer-targeting Therapy, Using Nanocarriers for Intractable Solid Tumors by Inhibition of TGF- $\beta$  Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 3460–3465.

Flt-1 immunoassay kit was purchased from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Gemcitabine was obtained from Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN). Avastin was obtained from F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland). Synthesis of thiolated block copolymer, and construction and confirmation of pDNA encoding sFlt-1 are shown in the Supporting Information. A block copolymer with X% of thiolation degree was abbreviated as "B-SHX%".

**Cell Lines and Animals.** Human embryonic kidney 293T cells (from RIKEN CELL BANK, Tsukuba, Japan) and human pancreatic adenocarcinoma BxPC3 cells (from ATCC, Manassas, VA) were maintained in DMEM and RPMI medium, respectively, supplemented with 10% FBS in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. 293T cells were chosen for *in vitro* experiments as cells that did not express sFlt-1.<sup>14</sup> Balb/c nude mice (female, 5 weeks old) were purchased from Charles River Laboratories (Tokyo, Japan). All animal experimental protocols were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as stated by the National Institutes of Health.

**Preparation of Polyplex Micelles.** Each block copolymer was dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), followed by the addition of 10-times-excess mol of dithiothreitol (DTT) against thiol groups. After 30 min incubation at room temperature, the polymer solution was added to a twice-excess volume of 225 µg/mL pDNA/10 mM Tris-HCl (pH 7.4) solution to form polyplex micelles with N/P ratio = 2. Note that N/P ratio was defined as the residual molar ratio of amino groups of thiolated PEG-PLys to phosphate groups of pDNA. The final pDNA concentration was adjusted to 150 µg/mL. After overnight incubation at room temperature, the polyplex micelle solution was dialyzed against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.5 vol% DMSO at 37 °C for 24 h to remove the impurities, followed by 24 h of additional dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) or 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) to remove DMSO. During the dialysis, the thiol groups of thiolated block copolymers were oxidized to form disulfide cross-links. In the *in vivo* experiments, the polyplex micelle solution was adjusted to a concentration of 100 µg of pDNA/mL in 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) with 150 mM NaCl.

**Dynamic Light Scattering (DLS) Measurement.** The size of the polyplex micelles was evaluated by DLS using Nano ZS (ZEN3600, Malvern Instruments, Ltd., U.K.). A He-Ne ion laser (633 nm) was used as the incident beam. Polyplex micelle solutions with N/P = 2 from 3 different batches were adjusted to a concentration of 33.3 µg of pDNA/mL in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). The data obtained at a detection angle of 173° and a temperature of 37 °C were analyzed by a cumulant method to obtain the hydrodynamic diameters and polydispersity indices ( $\mu I^2$ ) of micelles.

**Zeta-Potential Measurement.** The zeta-potential of polyplex micelles was evaluated by the laser-Doppler electrophoresis method using Nano ZS with a He-Ne ion laser (633 nm). Polyplex micelle solutions with N/P = 2 from 3 different batches were adjusted to a concentration of 33.3 µg pDNA/mL in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). The zeta-potential measurements were carried out at 37 °C. A scattering angle of 173 °C was used in these measurements.

**Real-Time Gene Expression.** 293T cells (100,000 cells) were seeded on a 35 mm dish and incubated overnight. After replacement with fresh medium containing 0.1 mM D-luciferin, each type of polyplex micelle (N/P = 2) containing 3 µg of Luc pDNA was added. The dishes were set in a luminometer incorporated in a CO<sub>2</sub> incubator (AB-2550 Kronos Dio, ATTO, Tokyo, Japan), and the bioluminescence was monitored every 10 min with an exposure time of 1 min. Reproducibility was confirmed by triplicate experiments.

**Antitumor Activity Assay.** Balb/c nude mice were inoculated subcutaneously with BxPC3 cells ( $5 \times 10^6$  cells in 100 µL of PBS). Tumors were allowed to grow for 2–3 weeks to reach the proliferative phase (the size of the tumors at this point was approximately 60 mm<sup>3</sup>). Subsequently, polyplex micelles (20 µg of pDNA/mouse), gemcitabine (100 mg/kg), or Avastin (50 mg/kg) maintained in 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) with 150 mM NaCl were injected via the tail vein either 3 times (Figure 2a) or 5 times (Figure 2b) at 4-day intervals. Gemcitabine and Avastin doses and injection regimens were according to the previous reports published elsewhere.<sup>15,16</sup> A polyplex micelle containing Luc pDNA was used as a control formulation containing the nontherapeutic gene. Tumor size was measured every second day by a digital vernier caliper across its longest (*a*) and shortest diameters (*b*), and its volume (*V*) was calculated according to the formula  $V = 0.5ab^2$ .

**In Vivo sFlt-1 Gene Expression.** Polyplex micelles loading either sFlt-1 or Luc pDNA (20 µg pDNA) were injected into the BxPC3-inoculated mice via the tail vein on days 0 and 4. Mice were sacrificed on day 6 after collecting blood, and the lungs, livers, spleens, kidneys, and tumors were excised. The excised organs were treated in 500 µL of cell culture lysis buffer (Promega, Madison, WI), homogenized, and centrifuged. The sFlt-1 concentration of supernatants was evaluated using the immunoassay kit according to the manufacturer's protocol. Note that block copolymers and polyplex micelles did not interfere with ELISA (Figure 2 in the Supporting Information).

**Vascular Density in the Tumors.** Polyplex micelles loading either sFlt-1 or Luc pDNA (20 µg of pDNA) and Avastin (50 mg/kg) were injected into the BxPC3-inoculated

(14) Kim, W. J.; Yockman, J. W.; Lee, M.; Jeong, J. H.; Kim, Y. H.; Kim, S. W. Soluble Flt-1 Gene Delivery Using PEI-g-PEG-RGD Conjugate for Anti-angiogenesis. *J. Controlled Release* 2005, 106, 224–234.

(15) Braakhuis, B. J. M.; van Dongen, G. A. M. S.; Vermorken, J. B.; Snow, G. B. Preclinical In Vivo Activity 2',2'-Difluoro-deoxy-cytidine (Gemcitabine) against Human Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 1991, 51, 211–214.

(16) Gerber, H. P.; Ferrara, N. Pharmacology and Pharmacodynamics of Bevacizumab as Monotherapy or in Combination with Cytotoxic Therapy in Preclinical Studies. *Cancer Res.* 2005, 65, 671–680.