

心筋への毒性については心臓毒性が知られているが、ナノ粒子(リポソーム)化したドキシルにすることにより、心臓への蓄積もなく、より有効性があることがわかったが、こちらは皮膚への蓄積が生じ、皮膚傷害が出現することが問題になっている。いずれにしろ化学療法剤を用いるかぎりは何らかの副作用

は不可避である。皮膚傷害のほうが心臓毒性よりましということである。

以上にあげた化学療法剤の細胞毒性にもとづく作用以外の作用機構をもつ多くのナノメディシンが開発されている。たとえば、〈図4c〉に示すAuroShell(オーロシェル)は金ナノ粒子でこれもEPR効果にもとづき腫瘍

局所に集積する。これが腫瘍部に集積したところで、近赤外線を照射すると、金ナノ粒子が加熱され、その熱によって腫瘍とその血管を破壊するが、ナノ粒子の蓄積のない正常の健常組織に影響はない。オーロシェルは現在、頭頸部腫瘍に対する第1相試験が進行中である。

コラム 複雑系としてのがん治療とダイナミクス

著者らはナノ粒子からみたがん治療作戦を物質論の立場から概観している。当記者はEPR効果の発見¹⁾に続き、それに関する担がん生体における宿主側のEPR効果をもたらす生化学的薬理学的メディエーター(内因性因子)の多くを明らかにした。たとえば、そのメディエーターとしてはブラジキニン、NO(一酸化窒素)、プロスタグランジン、一酸化炭素(CO)などである^{2) 3)}。その場合、生体由来のメディエーターの薬理学的応答により、物質移動のダイナミクスが多様に変化することに注目している。すなわち、それらのメディエーターは腫瘍と炎症部で特異的に産生が高くなっているためである。その結果として腫瘍血管の透過性(その血管外腔への漏出性)が亢進し、血管の直径や血管内皮細胞間の間隙は拡張している^{2), 3)}。この知見にもとづき当記者らはさまざまなメディエーターの投与によって、ナノメディシンのデリバリーを腫瘍部選択的に顕著に増強することが可能になることを証明した。さらにその操作により人為的に血圧を上げるなどにより、ナノメディシンのがん部より深部への到達性を増強できるこ

とも明らかにし、臨床応用を行っている⁴⁾。

腫瘍局所でこれらの生成を人為的に高める物質、たとえばニトログリセリン、降圧剤のACEインヒビター(エナラプリルなど)、高分子化ヘミンなど、さらにアンジオテンシンの超微量の静脈内注入によって全身血圧を上げるなどの操作によりナノ粒子の腫瘍へのデリバリーを2~3倍上げることができ、その結果、抗腫瘍効果も上昇すると同時に副作用も抑えられる^{2) 3)}。上記の血圧を上げた(たとえば110→150 mmHgに)状態では、腫瘍血管選択的に薬物の漏出・浸透性が大きく上がり、難治性の高度進行がんにも有効になるとの報告をしている⁴⁾。このような手法はナノメディシンを使ったときのみ顕著である。

EPR効果は生体親和性のある高分子化(>分子量4万)薬剤でみられるが、そのうちのポリエチレングリコール(PEG)の結合物はよく用いられる。PEGで被覆された粒子は血中半減期は延長し、EPR効果で腫瘍局所に集積するが、次のステップとしてその局所のがん細胞内へのとり込みが抑制されてしまう。そのことが

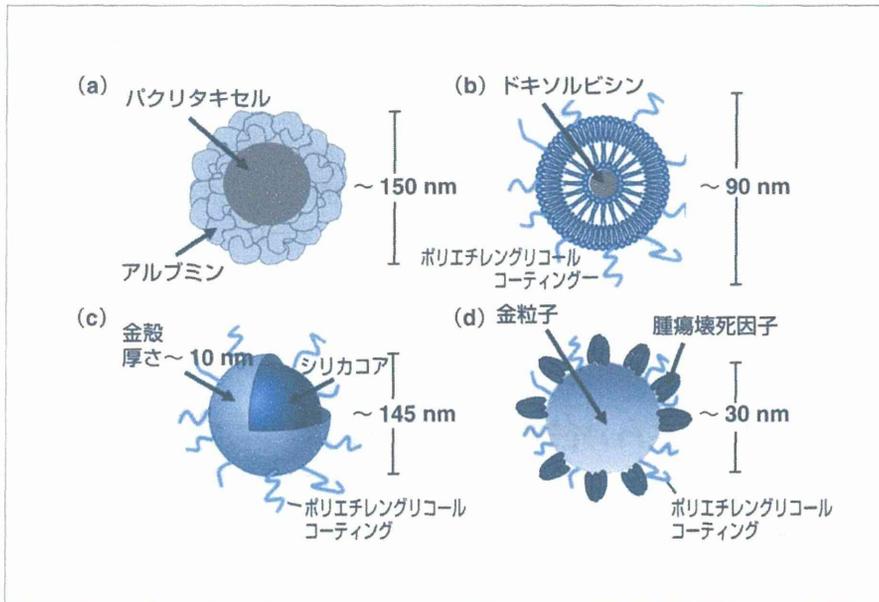
PEG化薬剤のジレンマといえる^{5), 6)}。

また別の事例として、高分子化ナノメディシン(ポリマー)と腫瘍の治療の標的となるレセプターに結合するリガンド素子分子を結合した場合、そのリガンドの結合数が多くなるに従って生体親和性が低下し、血中半減期が短くなる。それはとりもなおさずEPR効果を下げることになり、腫瘍集積性も低下するという別のジレンマが出現する。

[前田 浩]

コラムの参考文献

- 1) Y. Matsumura and H. Maeda: *Cancer Res.* **46**, 6387-6392(1986)
- 2) H. Maeda: *Proc. Jpn. Academy, Series B.* **88**, 53-71(2012)
- 3) H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang: *Adv. Drug Deliver. Rev.* (available online, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.10.002)
- 4) A. Nagamitsu, K. Greish, H. Maeda: *Japan. J. Clinical Oncol.* **39**, 756-766(2009)
- 5) H. Nakamura, J. Fang, B. Gahininath, K. Tsukigawa, H. Maeda: *J. Control. Release* **155**, 367-375(2011)
- 6) H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Harashima: *Gene Ther.* **14** (1), 68-77(2007)



〈図4〉がん治療をめざしたナノメディシンのいくつか

臨床に用いられているもの、あるいは治験中の4例のナノ粒子の構造の模式図。(a)アブラキサンはセルジーン (Celgene) 社が開発したナノ粒子で、血清タンパク質のアルブミンに低分子性制がん剤のバクリタキセルが結合したものである。(b)はジョンソン・エンド・ジョンソン社のドキソルビシンである(イスラエルの発明)。これはもともと低分子のドキソルビシンを包含するリポソーム製剤であったが、血中での消失を抑えるため、その表面をポリエチレングリコール(PEG)により被覆している(PEG化リポソームという)。(c)はナノスペクトラ・バイオサイエンス社のオーロシェルで、これは通常の制がん剤を含まない金のナノ粒子である。その投与後、近赤外線レーザー照射によりそのがん局所の温度を上昇させ、その熱により制がん効果を示す。(d)はサイトイミュン・サイエンス社のオーリイムンで、腫瘍壊死因子(TNF)を金のナノ粒子の表面にまぶしたものである(本文参照)。

次世代型薬剤への新たな挑戦

当然のことながら、ナノ粒子の製剤化も限界がないわけではない。いわゆるナノメディシンを大量に製造するにあたって、高度の品質管理と再現性が大きな障害になりうる。多くの研究室では試験管内の実験成果の理論的裏づけをmgのスケールでできるとしても、kgスケールとなるとそれなりの経済的な製造コストの問題に加え、大規模バッチの製造下での、まったく同一の品質を担保することの問題は大きな課題である。

さらに、ナノ粒子は数百、さらには数千の原子を含んでいる。化学構造のはっきり決まっている低分子と異なり、ナノ粒子においてはいかに高純度のものであっても、原子の数と配列は一定していないということである。その変動は〈図5〉にあるように明らかである。すべてのナノメディシンの材料(多くの場合ポリマー)を用いるため、その特徴としてサイズと形において広い分

散性をつねに示すことである。その結果としていえることは、ナノメディシンの性状は絶対的な一定の数値ではなくて、許容可能な範囲の値として決めなければならない。たとえば、腫瘍マーカー分子を標的とするある素子を含むナノメディシンの剤型設定において、ナノ粒子1個あたり、この標的マーカー素子の結合数は5~20個の範囲で機能をもたせている。

ナノメディシンの製造にあたっては十分かつ細心の制御された状況下で製造されることはいうまでもないが、バッチごとのばらつきは困るわけで、十分に性状を明らかにせねばならない。つまり、臨床応用に入る前には、ナノ粒子のサイズ、形状、表面の化学特性、凝集状態などを明らかにすべきである。ナノメディシンの性状はしばしば試料の多分散性にあるため、より複雑になるのである。したがって、同じ性状の測定も複数の方法によって確認せねばならない。たとえばサイズについていえば、電子顕微鏡^{*7}などを用いることにより詳細な理解が得られる。最近の米国FDAの規制概要書では、ナノメディシンの製造上の性状を決めるにあたってのいくつかの問題点を提示している。

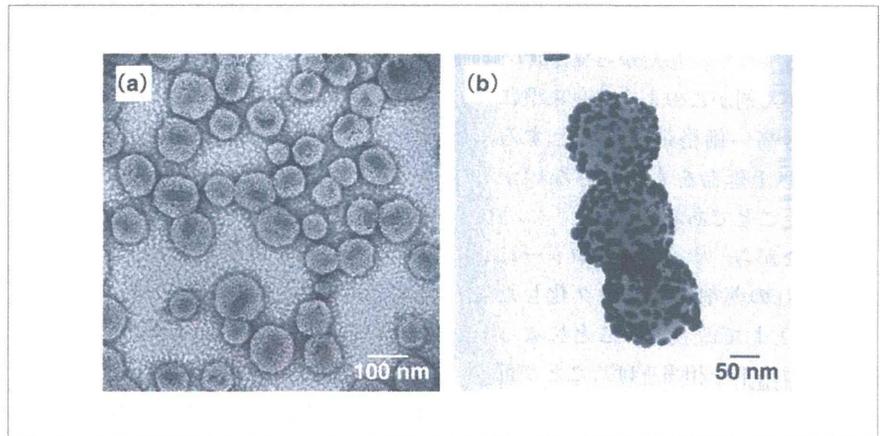
ナノテクノロジーによるがん治療の臨床展開を支援促進するため、米国国立がん研究所のナノテクノロジー評価研究部門(Nanotechnology Characterization Laboratory, NCL)はナノテク関連のがん治療法の研究開発や、その理論的実証的研究に対する支援を行い、また同時にナノメディシンの物理化学的性状、安全性および毒性について試験管内ならびに動物の系での実験的評価・検証も行って

*8 [訳注]まったく同じものでも静脈注射の速さ、すなわち、ゆっくりと点滴した場合とワンショットの急速注入の場合とでは異なる。後者のほうが血栓形成とか、ショックなどの可能性が高くなる。さらにマウスやラットの種類や系統が異なっても毒性が違うことがある。

*9 [訳注]いずれにしろ何百、何千という粒子の像の解析は難しく、サイズの分布状況などは統計学的により有意性の高いデータを得るためには、別の方法、たとえば光散乱法などで計測せねばならない。

いる。もちろん、FDAと米国国立標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology)とも密接な協力のもと、ナノ材料に関連する医薬の有効性の評価を行っている。またナノテクノロジーに関する各種方法論の情報をナノテク研究者やがん研究者に周知させることも行っている。これまでにNCLでは臨床応用をめざした250種以上のナノ粒子の評価を行っている。

ある実証的研究によればナノメディシンの性状についての解析と評価が重要であることを物語っている。たとえば、ある会社で作成されたがん治療を目的としたポリマー被覆型金ナノ粒子を米国国立がん研究所(NCI)で、動物での安全性の検討を行った。すなわち、その粒子の一般毒性をみるために助手がラットに静脈投与したところ、肺臓に予期せぬ出血病変を呈した。もとの製造会社でラットに投与したときは何ら病変を起こさなかったものである。そこで、担当のNCIの助手はもう一度、新しく合成したバッチを用いて詳しく再検討したところ、何ら病変を生じなかったという。そこでこの2つのバッチのサンプルを用いてくわしく検討したところ、両者間に何ら違いは見いだされなかった。両者はまったく同じ工程と手法で合成されており、両者のサイズも表面の荷電レベルも同じであり、電子顕微鏡による観察でも同じであった。そこで別の技師はこれらナノ粒子の表面の被覆状況を検討したところ、新鮮なバッチのほうが古いバッチよりも表面のポリマーの密度が高いことがわかった。また、古いほうのバッチのナノ粒子はより長期間的にわたり、イオンにさらされてい



〈図5〉電子顕微鏡像

(a)はドキシル、(b)のはのちにオーロシェルとなる初期の金のナノ粒子。電子顕微鏡は、光学顕微鏡では見えないナノ材料を可視化するのに有力な手段である。しかしながら、電子顕微鏡は同時に限られた数の粒子しか見えないので、全体としての粒子のばらつきや性状をみるには必ずしも適当でない。ここに示す電顕像では試料中のかざられたナノ粒子のサイズと形状のばらつきをみるのにはよい^{*9}。(Courtesy of Ulrich Baxa.)

たようで、その結果生じたわずかな表面のポリマー密度の差が*in vivo*においては大きな差となって現れるというわけで、究極的には一方は実質的には安全であるが、もう一方はそうでないということになる^{*8}。

価格

新技術は必ずしも安くつくとは限らない。現在のところナノメディシンも例外ではない。FDAが認可している2つの抗がん性のナノメディシン、アブラキサンとドキシル製剤はもとの低分子型薬剤よりもはるかに高額である。アブラキサンとドキシルのそれぞれの1回の投与量の金額はそれぞれ5000ドル(約50万円)である。一方、低分子薬剤のタキソールではそれが500ドルであり、ドキシルに内包されているもとのドキシルピシンでは200ドル以下である。価格が高い理由としては、ナノ粒子薬の生体内での優位性のためであるという。つまり、ナノメディシンのほうがより毒性が低く、正常の臓器、組織に障害を与えない。その結果、患者のQOL(quality of life:生活の質)は低分子性のもとの薬よりはるかによいことである。とはいえ、これらのナ

*10 [訳注] 英国では国立医療評価研究所 (National Institute for Clinical Excellence, NICE) は、治療中、さらに治療の後も、その患者のQOLがよい状態で1年の延命をもたらす薬剤の妥当な価格帯として邦価 約400万円をめどとし、それより高いものは国の健康保険による支払いをすべきでないとしている。一方、わが国はほぼ放任状態である。

ノテク型新薬も追跡調査でわかったことは相対生存率の延長はわずかであることである^{9)~12)}。したがって、ノテク型制がん剤がこのように在来型に比べ1桁も高い価格帯であるとする、10倍以上延命をもたらさないかぎり困ったことである^{*10)}。

しかしながら、ナノテクノロジーには特許切れの薬剤をナノテク化したDDS製剤として改良することによって開発のコストを相当下げることが可能になると考えられる。一般に新薬は発見から、基礎研究、前臨床試験などの研究開発を経て、最終的にはヒトの臨床での有用性、有害性の評価の後、市場に供給するまでには、その経費は約1000億円を要するといわれている。その出費のかなりは開発中止になった数多くの薬の分も含まれるからであるが、臨床治験に進んでからでも、5種の候補薬のうち、毒性その他の好ましからざる作用のために最後まで残り、成功するのは1つだけである。したがって、開発中止になった候補新薬にかかった経費は生き残った新薬に上乘せされ、市場に出たときの価格を押し上げることになる^{*11)}。

製薬会社にとってナノテクノロジー型製剤(日本ではドラッグデリバリーシステム(DDS)型製剤といっている)は、在来は見捨てられていた薬剤も新薬の候補として、利用価値のあるものに変換する機会を与えてくれる。このことはシード化合物発見のコスト削減の立場からも重要な切り札になる。ナノテク化したDDS製剤によって在来の低分子薬剤にみられる好ましからざる性状を抑えることが可能となり、薬物の体内での動力学的改善とターゲティング能の向上の立場からも、より

*11 [訳注] その薬価については、日本では製薬会社と厚労省のネゴシエーションで決まるが、高額治療になると公費で支払うことになるので、本人負担は軽いものである。国庫による医療費は2012年に37.4兆円である。

*12 [訳注] しかしながら、PEGなどについては膨大な研究がある。

好ましい性状を付与することが可能になる。また、ナノ粒子薬剤はキャリアーとして用いる素材により水難溶性の各種の薬剤の溶解度を向上させることができ、多くの化合物に応用可能となる。またEPR効果による腫瘍標的性や徐放性を付与できるので、開発中止になった薬を再び生き返らせることができる。

そのような例として、1980~90年代に臨床治験が試みられたタンパク質性製剤の腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor, TNF)がある。TNFはもともと、強力な化学療法剤の候補であったが、強力な副作用のため開発中止になったものである。現在、オーリムューン(Aurimune)として再登場し、展開が期待されている。〈図4d〉に示すようなオーリムューンはナノサイズの金粒子の表面にTNFをまぶしたものである。その臨床第1相試験が最近行われたが、その結果は、在来の投与量の3倍量でも副作用なしで、静脈内投与が可能になっている¹³⁾。

安全性と環境への配慮

がん治療以外にナノ粒子を応用することはたいへん興味あるところであるが、同じ材料がヒトの健康や環境に思わぬ影響がでることがある。多くのナノ材料の急性毒性は一般に低いものであるが¹⁴⁾、その慢性毒性の立場からの評価は多くの研究論文をみても必ずしも満足されるレベルにあるとはいえない^{*12)}。

ナノテクノロジーに関する慢性的な健康被害の研究としてはカーボンナノチューブおよびカーボンナノ材料が大半である。たとえば、マウスの腹腔内に投与したカーボンナノチューブは、

*13 [訳注] いずれにしろこのように生体内で分解されず、長期に残留する物質は要注意である。

アスベストで生ずる中皮腫と同様の疾患を引き起こすという¹⁵⁾。しかしながら、最近の別の研究所は、ナノチューブとフラーレンの毒性は低く¹⁶⁾、また化学修飾により毒性は減らせるという^{*13)}。たとえばナノチューブの吸入によって奇病が生ずるとしても、その毒性はナノ材料自体というよりも、そのもつ特殊な構造、たとえば繊維状構造をとっているために生ずる固有の現象なのかどうかは不明である^{17), 18)}。

ナノ材料の健康と安全性についてのリスク評価はいくつかの要因によって複雑なものになっている。たとえば同じナノ材料でも、異なった会社由来のものは必ずしも同一の性状を示さないことがあり、また経時的に変質することがある。たとえば空気中のナノ粒子は急速に凝集し、沈降速度や肺内の沈着が変わってくる。もっとも重要なことは、リスクと有害性評価に対して、十分な解析がなされていないナノ材料では、その有害性がナノ材料のどの特性によって生じているか明らかでないことである。有害性評価における混乱要因の1つはたとえばナノ粒子の可溶化や、凝集防止に用いられている界面活性剤のような分散剤の使用である。これはつまり、分散剤それ自体が、毒性があることがあるので、ナノ材料の暴露実験だけではわからないかもしれない。

ナノ材料の製造過程であれ、使用に際してであれ、その毒性、健康への悪影響はそれが現実のものか、あるいは予測されたレベルのものかは別として、ナノテクノロジーががん治療、あるいはそれ以外の用途に際して、社会にもたらす有害性と利益とのバランス

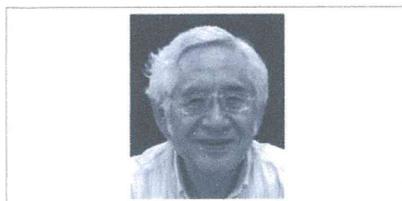
を考慮して判断すべきであろう。

★ ★ ★

がんの生物学に関する有益な検討をいただいたパヴァン・アジセサイア (Pavan Adisheshaiah) 博士に感謝する。本研究課題は国立がん研究所 (NCI/NIH) の助成金による。本論文の内容は健康保健省 (Department of Health & Human Service) の見解あるいは方針を示すものではない。また、とり上げた商品名、製品あるいは企業は米国政府の承認を意味するものではない。

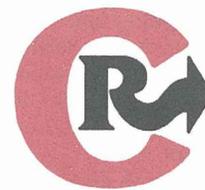
参考文献

- 1) D. Hanahan, R. A. Weinberg: Cell **100**, 57 (2000).
- 2) S. K. Hobbs *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 4607(1998).
- 3) H. Maeda: Bioconjugate Chem. **21**, 797 (2010).
- 4) J. V. Jokerst *et al.*: Nanomedicine (London) **6**, 715(2011)
- 5) M. Ferrari: Trends Biotechnol. **28**, 181 (2010)
- 6) R. K. Jain, T. Stylianopoulos: Nat. Rev. Clin. Oncol. **7**, 653(2010)
- 7) C. Wong *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**, 2426(2011)
- 8) K. Tyner, N. Sadreih: Methods Mol. Biol. **697**, 17(2011)
- 9) W. J. Gradishar *et al.*: J. Clin. Oncol. **23**, 7794(2005)
- 10) D. W. Northfelt *et al.*: J. Clin. Oncol. **16**, 2445(1998)
- 11) M. E. R. O'Brien *et al.*: Ann. Oncol. **15**, 440(2004)
- 12) A. Gaitanis, S. Staal: Methods Mol. Biol. **624**, 385(2010).
- 13) S. K. Libutti *et al.*: Clin. Cancer Res. **16**, 6139(2010)
- 14) S. T. Stern, S. E. McNeil: Toxicol. Sci. **101**, 4(2008)
- 15) C. A. Poland *et al.*: Nat. Nanotech. **3**, 423 (2008)
- 16) M. L. Schipper *et al.*: Nat. Nanotech. **3**, 216(2008).
- 17) G. Oberdörster, V. Stone, K. Donaldson: Nanotoxicology **1**, 2(2007)
- 18) K. Donaldson, C. A. Poland. Nat. Nanotech. **4**, 708(2009)



前田 浩(まえだ・ひろし)

崇城大学DDS研究所特任教授、熊本大学名誉教授。医学博士および農学博士。フルブライト奨学生カリフォルニア大学大学院 (Davis校) (MS. 1964年)。1968年東北大学大学院農学系研究科 (医学部細菌学)・化学療法専攻博士課程修了。1968年ハーバード大学がん研究所、1981年熊本大学医学部教授、2004年崇城大学薬学部教授。アピールポイントは、世界最初の高分子結合型制がん剤スマンクスの発明とその動注療法の完成。その間、高分子性ナノ分子による腫瘍に選択的なデリバリーの原理 [EPR効果] を発見した (1986年)。EPR効果はこれまでに世界で約1万5千回も引用されている。おもな研究分野は、腫瘍選択的デリバリー (DDS) と高分子制がん剤の研究、がん予防・感染における活性酸素の役割。おもな著書は、"Neocarzinostatin: The Past, Present, and Future of an Anticancer Drug" (Springer-Verlag, 共編)。『21世紀の健康を考える 活性酸素と野菜の力』(幸書房)。趣味はワイン。



Two step mechanisms of tumor selective delivery of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugated with pirarubicin via an acid-cleavable linkage

Hideaki Nakamura^{a,b}, Tomas Etrych^c, Petr Chytil^c, Manami Ohkubo^a, Jun Fang^{a,b}, Karel Ulbrich^c, Hiroshi Maeda^{b,*}

^a Laboratory of Microbiology and Oncology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, Ikeda 4-22-1, Nishi-ku, Kumamoto 860-0082, Japan

^b Research Institute for Drug Delivery Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, Ikeda 4-22-1, Nishi-ku, Kumamoto 860-0082, Japan

^c Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2013

Accepted 13 November 2013

Available online 21 November 2013

Keywords:

HPMA polymer conjugate

Pirarubicin (THP)

Tumor selectivity

Acid-cleavable linkage

Hydrazone

EPR effect

ABSTRACT

N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide copolymer containing hydrazide groups (PHPMA) conjugated with pirarubicin (THP) via a hydrazone bond (PHPMA-hyd-THP) is a drug conjugate that releases THP in the acidic milieu of a tumor. PHPMA-hyd-THP has an apparent Mw of 40,000 and a hydrodynamic diameter of 8.2 ± 1.7 nm but no apparent plasma protein binding. PHPMA-hyd-THP possesses two mechanisms of selectivity toward solid tumors and has potent antitumor action. The first one is drug accumulation in tumors that depends on the enhanced permeability and retention (EPR) effect, which results in a 4–20 times higher concentration of drug in the tumor than in normal tissues such as the heart, lung, and intestine. This accumulation in tumor tissue is in great contrast to that of conventional low-Mw THP. The second one is pH-dependent release of drug from PHPMA-hyd-THP: this conjugate released free THP more efficiently at a lower pH, which exists in tumors, and exerts cytotoxic activity. Free THP is known for its much faster uptake into tumor cells compared with doxorubicin. Thus, in our *in vitro* study, PHPMA-hyd-THP showed a higher cytotoxicity at the lower pH of tumor tissue than at the neutral pH of normal tissue. Furthermore, much more THP was liberated from the conjugate in acidic tumor tissue than in normal tissue. The EPR effect-dependent accumulation of PHPMA-hyd-THP and tumor-selective THP release in the tumor tissues led to highly tumor-selective drug accumulation, which continued for more than 72 h, whereas the lowest free drug concentration was detected in normal tissues at 24 h and no longer at a later time. In conclusion, we determined in our study here that the acid-cleavable PHPMA-hyd-THP conjugate had an excellent antitumor effect without appreciable adverse effects.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The tumor-targeting principle of the enhanced permeability and retention (EPR) effect of macromolecules in solid tumor was originally described by Matsumura and Maeda in 1986 [1]. The EPR effect is attributed to (i) the aberrant architecture of tumor blood vessels, (ii) the elevated production of various vascular permeability factors, and (iii) the lack of functional lymphatic drainage in tumor tissue [1–3]. These tumor-specific features lead to the accumulation of biocompatible macromolecules in tumor tissue, which results in a superior antitumor effect with far fewer adverse effects. Recent progress in designing nanomedicines with antitumor effects has utilized the EPR effect as a prime principle [4,5]. For macromolecular drug carriers, e.g. liposome, polyethylene glycol, and poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) (PHPMA) conjugates were widely used. PHPMA is nontoxic, non-

immunogenic, and ratio of drug to PHPMA can be easily controlled. High Mw PHPMA (more than 40 kDa) remains in the systemic circulation longer, thus it preferentially accumulates in the tumor tissue by enhanced permeability and retention (EPR) effect [6]. Therefore, conjugation of the antitumor drug to the PHPMA enhances the tumor accumulation property of the antitumor drug.

During the past decade, many extensive studies failed to determine the drug characteristics required for selective delivery of the drugs to tumors and for the optimal therapeutic effect. For instance, despite marked accumulation of macromolecular or liposomal antitumor drugs in tumors, many cases showed insufficient antitumor effects [7,8]. This finding may be attributed to inadequate release of drugs at the tumor site and/or poor intracellular uptake of macromolecular drugs even when the drug was delivered to the tumor tissue. In nanomicelles or liposomal drugs, an active pharmaceutical drug is encapsulated in the core of the micelles and must be released from the nanoparticles to exert its therapeutic effect [7,9]. However, these micelles or macromolecular drugs require adequate stability when they exist in the systemic circulation. Thus, to achieve a superior EPR effect,

* Corresponding author at: Institute for DDS, Sojo University, Ikeda 4-22-1, Nishi-ku, Kumamoto 860-0082, Japan. Tel.: +81 96 326 4114; fax: +81 96 326 3185.

E-mail address: hirmaeda@ph.sojo-u.ac.jp (H. Maeda).

the plasma half-life of these macromolecular drugs must be several hours or days. Solving these difficult requirements continues to be a great challenge and has involved various cancer-specific approaches utilizing proteases, lower pH, redox potential, and external stimuli such as heat, ultrasound, and light for tumor-selective drug delivery [8,10].

For this study, we chose a pH-sensitive linker to attach drugs to polymers as a promising strategy for the efficient release of antitumor drugs from macromolecules at tumor sites. Cleavage and release of drugs must proceed in lysosomes, with a pH of 5.0–5.5, and in the tumor tissue (milieu), which has an intrinsic pH of 6.5–6.9. This pH clearly differs from the neutral pH of 7.4–7.6 in blood or normal interstitial tissue [11–13]. We report here the development of pH-sensitive water-soluble polymer-drug conjugates containing a hydrazone bond [14] that linked THP and poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) (PHPMA), that was effectively cleaved at the acidic tumor pH of 6.5–6.9, and that liberated free THP. We showed in an earlier study that an acid-cleavable macromolecular drug with doxorubicin attached via a hydrazone bond had a much higher cytotoxic effect compared with the noncleavable drug [15]. Rihova et al. reported that PHPMA conjugated to doxorubicin via a hydrazone linkage showed pronounced antiproliferative activity in K562 cells with a limited lysosome content [13]. Moreover, an acid-cleavable hydrazone conjugate showed superior cytotoxicity compared with the lysosomal protease-degradable peptide conjugate in an *in vitro* cytotoxicity assay [15,16]. Yang et al. previously reported that endocytosis, in folate receptor-mediated endocytosis, was not sufficient to cleave the hydrazone linkage in KB cells [17]. These results suggest that acid-cleavable conjugates may be partly cleaved outside the cells and that released free drug is internalized into the cells, which leads to cell death. Related to these results, the lower pH of tumor tissue (6.5–6.9), in contrast to the pH of normal tissue (7.4–7.6), will facilitate cleavage of the hydrazone bond.

4'-*O*-Tetrahydropyranilydoxorubicin (pirarubicin, or THP), used in this study, is an anthracycline antibiotic originally discovered by Umezawa et al. [18]. THP is approved in Japan for treatment of various cancers such as breast cancer, head and neck cancer, uterine cancer, leukemia, and lymphoma. Despite its superior antitumor effect, THP, as with other low-Mw anticancer agents, widely distributed throughout the body, thus causes adverse effects such as bone marrow suppression and myocardial infarction. Thus, improved control of the body distribution of THP is essential.

An important reason for choosing THP, rather than other anthracycline antibiotics such as doxorubicin, as the conjugation drug is that free THP has an intracellular uptake that is about 100 times faster than that of other drugs [19]. After free THP is delivered to the area around tumor cells, the cells internalize it very quickly, and it exerts rapid potent cytotoxic effects—a clear advantage. The slower cell uptake of doxorubicin, in contrast, may cause diffusion into the systemic circulation and result in toxicity in the normal tissue.

We expected this pH-sensitive polymer-conjugated drug to accumulate in tumor tissue via the EPR effect and to release free THP selectively in the tumor tissue outside and/or inside the cells, but not much would be released in normal tissues with pH values at or above 7.0. This means that the THP-polymer conjugate with the hydrazone bond to PHPMA (PHPMA-hyd-THP) would confer two types of tumor selectivity, one via the EPR effect and the other via the lower pH environment of tumor tissue. The result would be excellent antitumor activity with fewer adverse effects.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Male ddY mice were purchased from Kyudo Co., Ltd., Saga, Japan. Dulbecco-MEM (DMEM) was purchased from Nissui Seiyaku, Tokyo, Japan. Reagent-grade salts and solvents were purchased from Wako

Pure Chemical Industry, Osaka, Japan. 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) was purchased from Dojindo Chemical Laboratories, Kumamoto, Japan. Fetal bovine serum was purchased from Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan.

2.2. Synthesis of PHPMA-hyd-THP

PHPMA-hyd-THP was synthesized as described in a previous paper but with pirarubicin instead of doxorubicin [13].

2.3. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Gel permeation chromatography was performed with a Shodex multimode size exclusion column, Asahipak GF-310 HQ (Showa Denko, Tokyo, Japan) (300 mm × 7.5 mm), with photodiode array detection at 488 nm; elution was with dimethylformamide at 0.5 ml/min. Size exclusion chromatography was performed by using a OHPak SB-804 HQ column (Showa Denko, Tokyo, Japan) (300 mm × 8.0 mm), with photodiode array detection at 488 nm and 280 nm; elution was with 0.01 M phosphate-buffered 0.15 M saline (PBS) at 0.5 ml/min. Molecular weight and polydispersity of the PHPMA-hyd-THP conjugate was determined with a Shimadzu HPLC system equipped with RI, UV and multiangle light scattering DAWN EOS (Wyatt Co., USA) detectors using a TSKgel G3000SWXL column (300 × 7.8 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of 20% 0.3 M acetate buffer (pH 6.5; 0.5 g/L Na₂) and 80% methanol at a 0.5 ml/min flow rate.

2.4. Dynamic light scattering and zeta potential

The polymer conjugate PHPMA-hyd-THP was dissolved in PBS at 1 mg/ml and was filtered through a 0.2-μm filter attached to a syringe before analysis at room temperature. The particle size and surface charge (zeta potential) were measured in PBS by using the ELS-Z2 dynamic light scattering instrument (Otsuka Photol Electronics Co. Ltd., Osaka).

2.5. Assay to measure release of free THP

PHPMA-hyd-THP was dissolved in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5) or in 0.2 M phosphate buffer (pH 6.8 or 7.4) and was then incubated at 37 °C for the indicated time periods. To quantify the released free THP from the conjugates, an aliquot of the buffered solutions mentioned above was added with an equal volume of 0.2 M sodium bicarbonate buffer (pH 9.8) and two times the volume of chloroform followed by vortexing to extract the free THP in the chloroform phase. The chloroform phase was then evaporated to dryness *in vacuo*, and the pellet was dissolved in acetonitrile. The amount of THP was quantified by means of HPLC.

2.6. Cytotoxicity assay

HeLa cells (human cervical carcinoma) or B16-F10 cells (mouse melanoma) were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum with 5% CO₂/air at 37 °C. To prepare the types of DMEM with different pH values (pH 7.4, 6.9, and 6.5), NaHCO₃ was added to DMEM (pH 6.5, 0.5 g/l; pH 6.9, 1.0 g/l; pH 7.4, 3.7 g/l). HeLa cells were then incubated with PHPMA-hyd-THP or free THP for 72 h at different pHs. The MTT assay was performed to quantify the cytotoxicity, with absorbance at 570 nm as usual.

2.7. Analysis of intracellular uptake of THP

HeLa cells were treated with 100 μg/ml THP-equivalent dose of PHPMA-hyd-THP for the indicated time periods. After treatment, cells were washed with PBS and were resuspended in PBS followed by sonication (Hielscher, Teltow, Germany) (30 W, 30 s). To measure the total

amount of THP, which consisted of parental PHPMA-hyd-THP and released free THP in the cells, equal volumes of 2 M HCl to the packed cell volume were added to the cell lysate and incubated at 50 °C for 1 h to hydrolyze the THP derivatives at the anthracycline backbone. To measure the liberated free THP in the cells, an equal volume of 0.2 M sodium bicarbonate buffer (pH 9.8) was added to the cell lysate, after which THP was extracted in the chloroform phase and quantified as before by using HPLC. The amount of THP was measured with a fluorescent detector (excitation wavelength, 488 nm, emission wavelength, 590 nm).

2.8. Measurement of *in vivo* antitumor activity

The care and maintenance of animals were undertaken in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee of Sojo University. Mouse sarcoma S-180 cells (2×10^6 cells) were implanted subcutaneously in the dorsal skin of ddY mice. When tumors reached a diameter of about 5 mm, 5 or 15 mg/kg THP-equivalent drugs in saline were injected intravenously (i.v.) at a volume of 0.2 ml per mouse. The tumor volume, body weight, and survival rate were recorded throughout the experiment period. The tumor volume (mm^3) was calculated as $(W^2 \times L)/2$ by measuring the length (L) and width (W) of the tumor on the dorsal skin.

2.9. Pharmacokinetics

S-180 tumor-bearing mice were administered 10 mg of THP equivalent/kg of free THP or PHPMA-hyd-THP. At the indicated time periods, mice were killed, blood samples were withdrawn, and tissues were dissected after perfusion of the vascular void with saline. Each tissue was homogenized after addition of PBS (900 μl /100 mg tissue). The amounts of total THP and released free THP in each tissue were measured as described above.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characteristics

PHPMA-hyd-THP is composed of poly-HPMA (Mw 38,500; polydispersity $I_n = 2.1$) and THP, as Fig. 1A shows. PHPMA-hyd-THP possessed no free THP (Fig. 1B, dotted peak). Loading of THP in PHPMA-hyd-THP was 8.6–10% (wt/wt). PHPMA-hyd-THP was highly water soluble (>50 mg/ml), and its molecular size in aqueous solution was 8.2 ± 1.7 nm, with a zeta potential of 0.62 ± 1.6 mV, as determined by dynamic light scattering (Fig. 1C). Size exclusion chromatography confirmed the behavior of PHPMA-hyd-THP in aqueous solution; it existed as a single entity in PBS at pH 7.4 (Fig. 1D). Furthermore, PHPMA-hyd-THP was stable in mouse plasma, and no obvious plasma protein binding was observed (Fig. 1D). These data clearly indicated that PHPMA-hyd-THP had a nano-size structure in aqueous solution and in the presence of blood plasma; these properties are favorable characteristics for a prolonged plasma circulation time, and they are most important for the tumor-targeting EPR effect to occur *in vivo*.

3.2. Cytotoxicity of PHPMA-hyd-THP *in vitro*

Cytotoxicity of PHPMA-hyd-THP was investigated by using HeLa and B16-F10 cells. Free THP showed potent cytotoxicity against both cancer cell types (IC_{50} : HeLa cells: 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$; B16-F10 cells, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); cytotoxicity of PHPMA-hyd-THP, however, was 5–10 times less than that of free THP (Fig. 2A and B). The lower cytotoxicity of PHPMA-hyd-THP may be attributed to its slower intracellular uptake, as seen in Fig. 2C. The slower intracellular uptake and lower cytotoxicity of macromolecular drugs are well-known phenomena; for example, the slower intracellular uptake of PEG-modified drugs is known as the PEG dilemma [20,21].

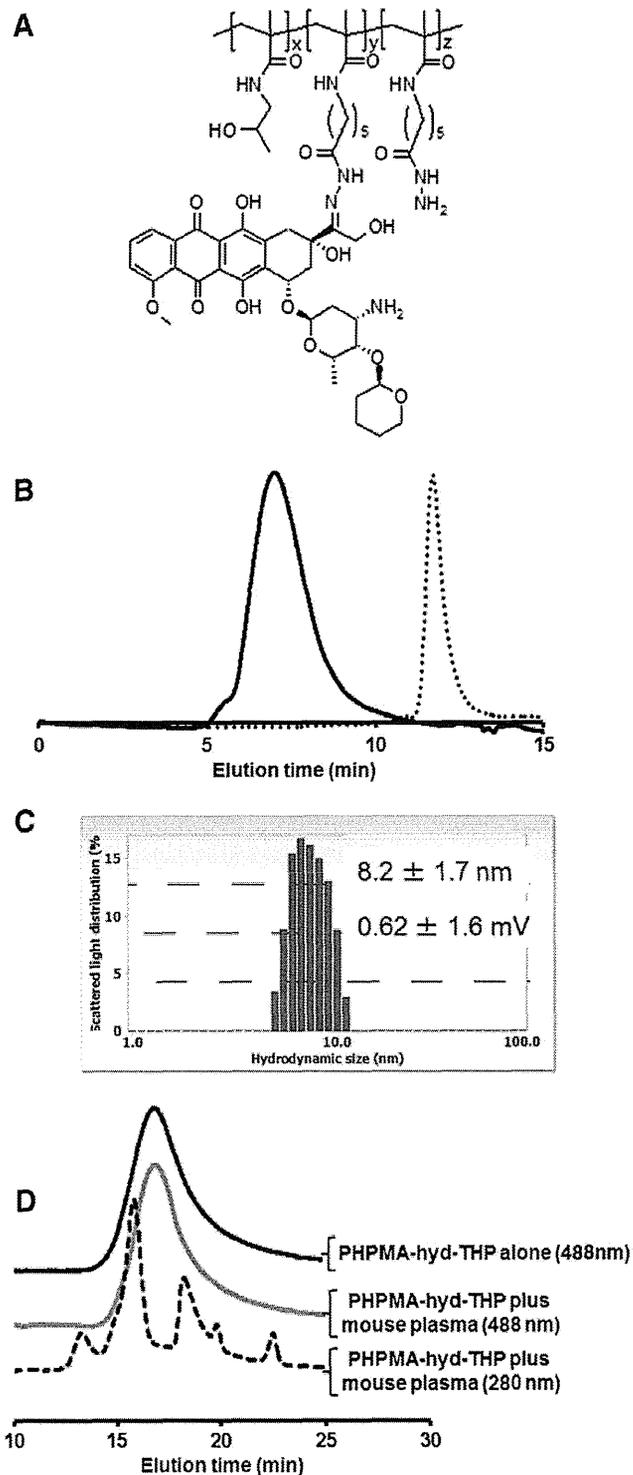


Fig. 1. Chemical structure and properties of PHPMA-hyd-THP. (A) Chemical structure of PHPMA-hyd-THP. (B) HPLC analysis of PHPMA-hyd-THP. PHPMA-hyd-THP or free THP was applied to a gel permeation chromatography column (Asahipak GF-310 HQ, 7.5×300 mm). Eluents were detected by means of a photodiode array detector with absorbance at 488 nm. (C) The apparent hydrodynamic diameter and zeta potential of PHPMA-hyd-THP at 1 mg/ml dissolved in PBS were measured by dynamic light scattering. (D) Plasma protein binding of PHPMA-hyd-THP. PHPMA-hyd-THP at 1 mg/ml was incubated with 20% mouse plasma for 60 min, after which size exclusion chromatography was performed. Eluents were detected with a photodiode array detector, with absorbance at 280 nm for plasma protein and 488 nm for PHPMA-hyd-THP. See text for details.

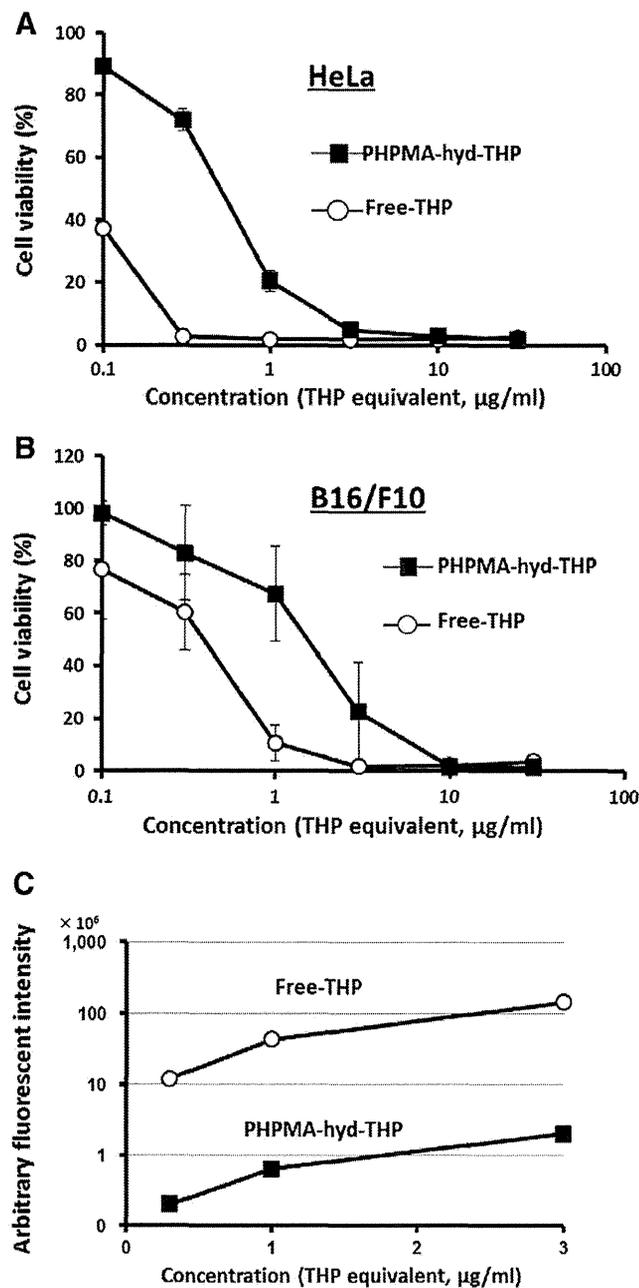


Fig. 2. Cytotoxicity and intracellular uptake of PHPMA-hyd-THP. (A) HeLa cells or (B) B16-F10 cells, plated in 96-well plates, were treated with increasing concentrations of free THP or PHPMA-hyd-THP at pH 7.4 for 72 h. The MTT assay was used to quantify the surviving cells, as a ratio of the surviving fraction to the untreated control. Values (%) are means \pm s.d. (C) Intracellular uptake of PHPMA-hyd-THP or free THP by HeLa cells. HeLa cells, plated in 12-well plates, were incubated with free THP or PHPMA-hyd-THP at pH 7.4 for 2 h. The amounts of intracellular THP were measured by using HPLC.

3.3. Release of active drug from the polymer conjugate and its cytotoxicity

We then examined the behavior of PHPMA-hyd-THP at different pH values. As shown in Fig. 1A, the hydrazone bond, an acid-cleavable linkage, was introduced between PHPMA and THP. As expected, free THP was released more efficiently at acidic pH (Fig. 3A). We then checked the relationship between the release of free THP from the polymer conjugate and cytotoxicity. PHPMA-hyd-THP and free THP were preincubated alone for 15 h at pH 5.5 or 7.4 and were then applied to HeLa

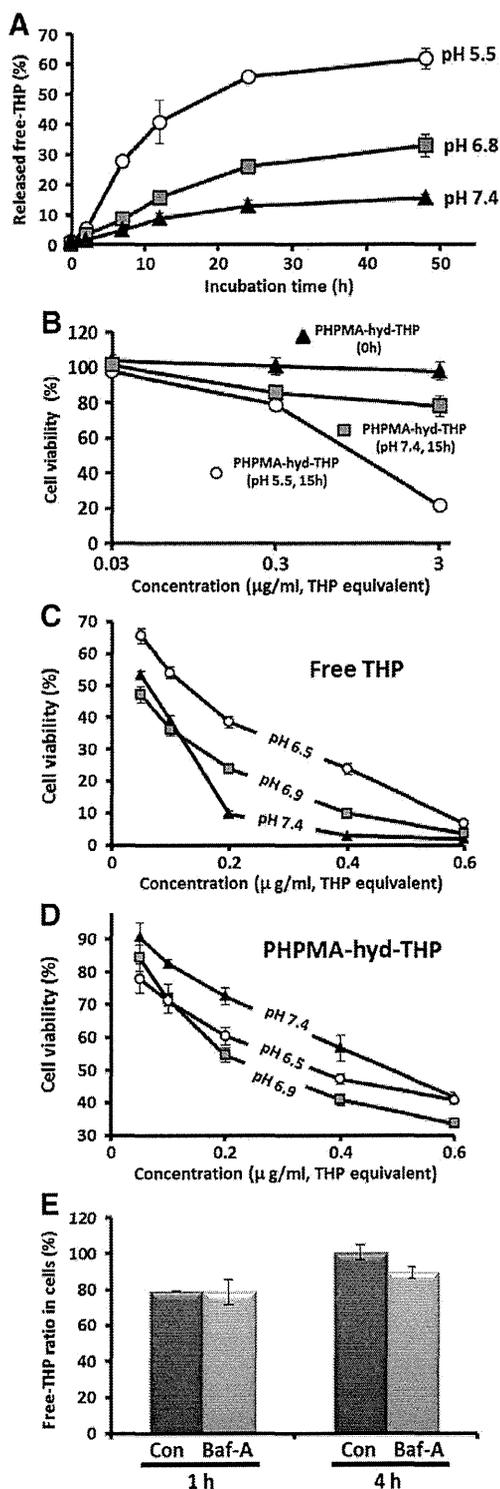


Fig. 3. pH dependence of free drug release from PHPMA-hyd-THP and cytotoxicity. (A) Release of free THP from PHPMA-hyd-THP at different pH values. PHPMA-hyd-THP at 1 mg/ml was dissolved in buffers with different pH values, followed by incubation at 37 °C for the indicated time periods. The amount of released free THP was measured by means of HPLC. (B) PHPMA-hyd-THP was incubated in different buffers adjusted to pH 5.5 or 7.4 for 15 h before application to HeLa cells for 2 h, followed by 72 h of culture in DMEM. (C) and (D) HeLa cells were incubated with increasing concentrations of (C) free THP or (D) PHPMA-hyd-THP in DMEM adjusted to pH 7.4, 6.9, or 6.5 for 72 h. The MTT assay was used to quantify surviving cells, as a ratio of the surviving fraction to the untreated control. (E) HeLa cells were incubated with PHPMA-hyd-THP for the indicated time periods with or without bafilomycin A1 (Baf-A). The free THP ratio in the cells was quantified by using HPLC. Con, control. Values are means \pm s.d.

cells for 2 h, followed by a 72-h incubation. The cytotoxicity of the free THP was not affected by preincubation conditions at various pH values (not shown), whereas preincubation of PHPMA-hyd-THP at pH 5.5 greatly enhanced its cytotoxicity (Fig. 3B). This result suggests that the release of free THP from PHPMA-hyd-THP is critical for its cytotoxicity.

We also investigated the cytotoxicity of PHPMA-hyd-THP at different pH values (pH 7.4, 6.9, and 6.5), with pH 7.4 representing normal tissue and pH 6.5 and pH 6.9 representing tumor tissue. Lower intracellular uptake and, hence lower cytotoxicity of doxorubicin at slightly acidic pH were previously reported [22]. We also found the pH dependent cytotoxicity of free THP as similar to doxorubicin (Fig. 3C) and likewise cellular uptake (data not shown). Free THP had a lower cytotoxicity when HeLa cells were cultured at the lower pH value, whereas PHPMA-hyd-THP demonstrated a somewhat higher cytotoxicity at lower pH values (pH 6.5 and 6.9) than at pH 7.4 (Fig. 3C and D). These results suggest that PHPMA-hyd-THP was more toxic in the tumor tissue environment than in the normal tissue environment, which indicates a tumor-selective toxicity, as well as tumor-selective accumulation, as described later.

Another issue is whether the cleavage and release of free drugs from the polymer conjugate would take place inside or outside the cells. Malugin et al. previously reported that noncleavable HPMA conjugated with doxorubicin (HPMA-GG-DOX) showed a much lower cytotoxicity (10,000 times lower) compared with free doxorubicin [23]. HPMA-GFLG-DOX, in which doxorubicin was conjugated to polymeric HPMA by a cathepsin B-cleavable peptide linkage (glycylphenylalanyl-leucylglycine, GFLG), had a 10 times higher cytotoxicity than HPMA-GG-DOX, a noncleavable conjugate, in a study of *in vitro* cytotoxic activity [23]. The GFLG linkage can be cleaved by cathepsin B (a lysosomal enzyme) or by a similar protease in some cancer cells, with the free doxorubicin being released in the lysosomal compartment, diffusing into the cytoplasm and nucleus, and then exerting pharmacological activity. This finding indicates that the liberation of free doxorubicin is critical for its pharmacological action.

Another biodegradable linkage is the hydrazone bond, which is utilized to liberate free drugs in acidic milieu such as lysosomal and cancer environments [13,14]. HPMA-hyd-DOX (polymeric HPMA conjugated to doxorubicin via a hydrazone bond) showed a far greater cytotoxicity (100 times more) than that of HPMA-GFLG-DOX [13]. This big difference in cytotoxicity between HPMA-hyd-DOX and HPMA-GFLG-DOX may indicate that part of the hydrazone bond is cleaved outside the cells, because intracellular uptake of HPMA macromolecules is much slower than that of free drugs. We therefore determined the amount of THP in PHPMA-hyd-THP-treated and free THP-treated cells. We treated HeLa cells with PHPMA-hyd-THP and quantified the amounts of the intracellular drugs, i.e., free THP and total THP, by using HPLC. Most of the drugs existed as free THP, not as PHPMA-hyd-THP, in cancer cells (Fig. 3E). Furthermore, treatment with bafilomycin A1, a lysosomal V-ATPase inhibitor, did not increase the PHPMA-hyd-THP ratio inside the cells (Fig. 3E). These results indicate that PHPMA-hyd-THP was mostly cleaved outside the cells, and then the released THP was internalized by the cells.

3.4. *In vivo* antitumor activity of THP-polymer conjugates

We next investigated *in vivo* antitumor activity of PHPMA-hyd-THP against mouse sarcoma S-180. Two THP-equivalent doses of free THP and PHPMA-hyd-THP at 5 mg/kg and 15 mg of THP per kg equivalent were administered once via the tail vein at 10 days after tumor cell inoculation, when the tumor diameter was 5–8 mm. Free THP was effective at both 5 and 15 mg/kg doses in mice and suppressed tumor growth throughout the experimental period (3 months); however, administration of free THP at 15 mg/kg to tumor-bearing mice caused two of five mice to die of toxicity (Fig. 4), and the body weight of the mice was markedly reduced (Fig. 4C). PHPMA-hyd-THP was more effective than free THP administered at 5 and 15 mg/kg; most mice were

completely cured as of day 90. The more important effects noted in this group included no body weight loss or acute death, so that all tumor-bearing mice treated with PHPMA-hyd-THP had survived by day 90, whereas the group treated with free THP at 15 mg/kg demonstrated only 40% survival (Fig. 4D).

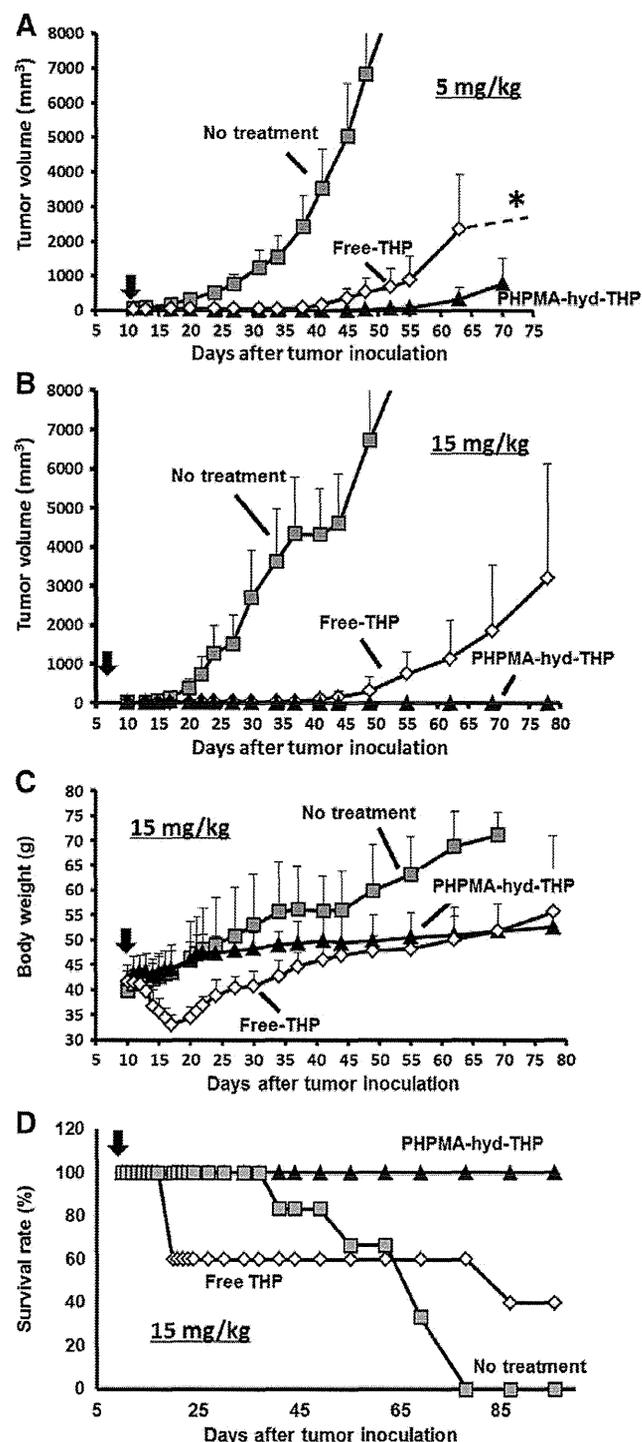


Fig. 4. Antitumor activity of PHPMA-hyd-THP *in vivo*. (A) and (B) PHPMA-hyd-THP or free THP was administered once at (A) 5 mg/kg or (B) 15 mg of THP per kg equivalent into S-180 tumor-bearing mice. (C) Body weight change and (D) survival rate after administration of 15 mg of THP per kg equivalent into S-180 tumor-bearing mice. Values are means \pm s.e. ($n = 5-6$). *One mouse out of five with largest tumor died, tumors of remaining mice continue to grow.