

生体直交型反応を利用したリポソーム製剤からの
薬物放出制御に関する研究

2022

薬品物理化学

甘中 健登

目次

略語表

序論-----	1
本論-----	5
第1章 両親媒性 Tz 誘導体の合成とリポソームへの応用-----	5
1-1 緒言-----	5
1-2 結果-----	7
1-2-1 両親媒性 Tz 誘導体 (化合物 1) の合成-----	7
1-2-2 Tz 誘導体と NB 誘導体との反応性の評価-----	7
1-2-3 Tz 誘導体を用いたリポソームの作製-----	8
1-2-4 POTz-liposome と NB 誘導体との化学反応の進行の検証-----	9
1-2-5 <i>In vitro</i> 薬物放出評価-----	10
1-2-6 蛍光色素を用いたリポソームの膜流動性の評価-----	13
1-2-7 単分子膜を用いた表面圧-分子 (占有) 面積、表面電位-分子面積に ついての評価-----	15
1-2-8 単分子膜の流動性に関する評価-----	20
1-2-9 単分子膜における混合による過剰ギブズ自由エネルギーの変化量に 関する評価-----	22
1-3 考察-----	23
1-4 小括-----	25

第2章 生体直交型反応を介した薬物放出制御型リポソーム製剤によるがん治療効果 の増強-----	26
2-1 緒言-----	26
2-2 結果-----	28
2-2-1 リポソームの組成検討-----	28
2-2-2 HSTz-liposome と NB 誘導体との化学反応の進行の検証-----	31
2-2-3 <i>In vitro</i> 薬物放出評価-----	31
2-2-4 HSTz-liposome と NBCOOH の細胞毒性評価-----	35
2-2-5 リポソームの体内動態評価-----	36
2-2-6 <i>In vivo</i> 薬物放出評価-----	38
2-2-7 治療評価-----	42
2-3 考察-----	44
2-4 小括-----	46
総括-----	47
謝辞-----	48
実験の部-----	50
第1章 実験の部-----	52
第2章 実験の部-----	58
参考文献-----	63

略語表

本文において以下の略号を用いた。

Chol: cholesterol

Cs: compressibility modulus

DDS: drug delivery system

DiO-C₁₈: 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate

DOX: doxorubicin

DSPC: 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine

DTPA: diethylenetriaminepentaacetic acid

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EPR: enhanced permeability and retention

GP: generalized polarization

HRMS: high-resolution mass spectrometry

HSPC: hydrogenated soybean phosphatidylcholine

ICG: indocyanine green

IEDDA: inverse electron demand Diels-Alder

Laurdan: 6-decanoyl-2-dimethylaminonaphthalene

NB: norbornene

2-NB: 2-norbornene

NBane: norbornane

NBaneCOOH: 2-norbornanecarboxylic acid

NBCOOH: 5-norbornene-2-carboxylic acid

NB(COOH)₂: 5-norbornene-2,3-dicarboxylic acid

NMR: nuclear magnetic resonance spectroscopy

PBS: phosphate-buffered saline

PEG-DSPE: 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino(polyethylene glycol)-2000]

POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine

RES: reticuloendothelial system

SDS: sodium dodecyl sulfate

SPAAC: strain-promoted azido-alkyne cycloaddition

T_c: critical temperature

TEA: triethylamine

THF: tetrahydrofuran

Tz: tetrazine

序論

ドラッグデリバリーシステム (DDS) とは、薬物の効果を最大限に発揮させることや、副作用を最小限に抑えることを目的に、その薬物の体内動態を制御する技術・システムのことである。必要最小限の薬物を、必要な場所に、必要な時 (タイミング・期間) に供給することを目指し、DDS の開発研究が進められている。これまでにリポソームやミセル、エマルジョン、脂質ナノ粒子、タンパク質、合成高分子など様々な DDS キャリアが開発されている[1,2]。リポソームは、内部に水相を有する脂質二分子膜の閉鎖小胞であり、1964 年に Bangham により発見された[3]。当初、リポソームは生体膜モデルとして利用されていたが、その後、内水相や膜中に様々な性質の薬物を封入し、それらの体内動態を制御できることが明らかとなり、ドラッグキャリアとして注目されるようになった。

現在臨床現場で用いられている Doxil[®]は、抗がん剤であるドキソルビシン (DOX) をリポソームに内封した DDS 製剤である。Doxil[®]は、ポリエチレングリコール (PEG) でリポソーム表面が修飾されており[4]、これにより、リポソームの表面に水和層が形成され、マクロファージによる異物認識が抑制されることから、肝臓や脾臓などの細網内皮系 (reticuloendothelial system, RES) への取り込みが低減し、その結果、リポソームの血液滞留性が向上することが知られている[5]。また、多くの固形がん組織では、血管新生が促進され、血管透過性が亢進している一方で、リンパ管の発達が未熟であるため、投与されたリポソームはがん組織に受動的に送達され、その部位に蓄積されていく。この現象は、enhanced permeability and retention (EPR) 効果として知られ[6,7]、Doxil[®]も EPR 効果を介してがんが高く集積する。しかし、Doxil[®]は、DOX の副作用である骨髄抑制や脱毛に加え、累積投与量の増加に伴う心毒性等の発症リスクを軽減する一方で、治療効果については低分子の DOX に対して優位性が認められていない[8,9]。その原因として Doxil[®]のリポソーム膜が非常に安定であるため、がん組織に集積しても DOX が十分に放出されず、がん部位での薬効発現が乏しいことが報告されている[10,11]。このように、PEG 修飾リポソームは、がんを標的とした化学療法に非常に有用であると考えられていたが、治療効果を改善するには至っていない。すなわち、リポソームを用いて効果的で安全な薬物治療を行うには、非標的部位での薬物の安定保持と、標的部位における速やかな薬物放出という相反する機能性の付与が求められる。

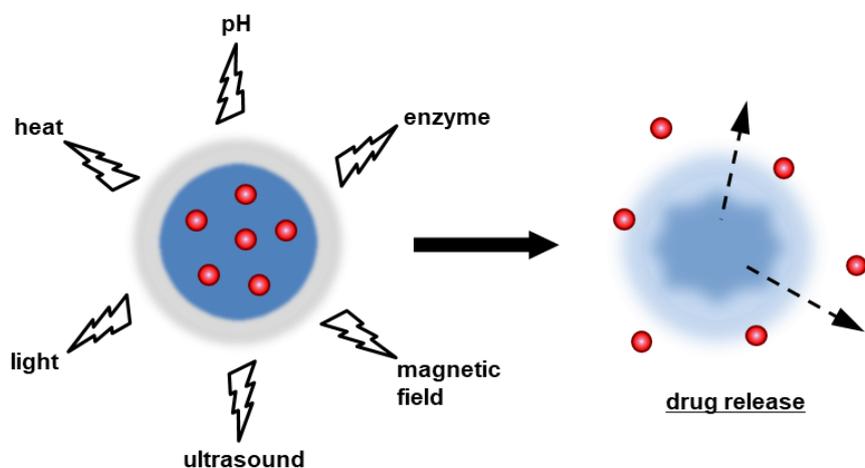


Fig. 1 Drug release from stimuli-responsive liposomes.

そこで、標的部位におけるリポソームからの効率的な薬物放出を実現するために、様々な刺激を利用した刺激応答型薬物放出制御法が開発されている (Fig. 1) [12,13]。例えば、がん微小環境や細胞内環境における低い pH[14–18]およびがん特異的に発現する酵素[19–23]による反応を利用する内部刺激や、熱[24–28]、光[29–34]、超音波[35–37]、磁力[38–40]等の外部刺激を利用した制御法が報告されている。これらの刺激を利用した場合、リポソームからの薬物放出が促進され、治療効果が改善することが報告されている。しかし、内部刺激を利用する場合、がんの微小環境は不均一である[41–43]ことから、治療効果に個人差が生じることが懸念される。また、外部刺激を利用する場合には、刺激自体による正常組織への物理的ダメージが懸念される。さらに、光は生体透過性が低いため、体深部での再現が困難であり、比較的体表近くに存在するがんに適用が制限されるという問題もある。したがって、既報の薬物放出制御法には依然として改善の余地があり、新たな機構に基づいた時空間的な薬物放出制御法の開発が求められている。

近年、生体直交型反応を利用した創薬研究が注目されている。生体直交型反応とは、夾雑な生体系において特定のユニークな官能基の組み合わせでのみ選択的に進行する反応のことであり、Bertozzi らにより **bioorthogonal reaction** と表現された[44]。この生体直交型反応を生体で応用する際に求められる条件として、反応速度、選択性、簡便性 (精製操作を必要としない等)、生体適合性のいずれもが高水準にあることが挙げられる [45]。これまでに様々な生体直交型反応が報告されているが、生命科学の分野ではアジドとアルキンによりトリアゾール誘導体を生成する歪み解消駆動型の **Huisgen 反応** (strain-promoted azido-alkyne cycloaddition, SPAAC) [44,46]や、テトラジンと様々な種類

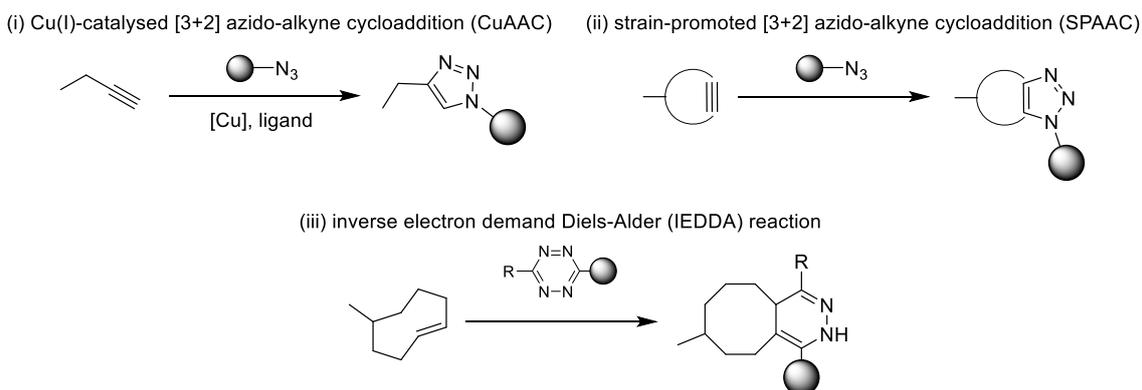


Fig. 2 Representative bioorthogonal reactions.

のジエノフィルとの逆電子要請型 Diels-Alder (inverse electron demand Diels-Alder, IEDDA) 反応[45]がよく用いられている (Fig. 2)。SPAAC では、アジドとアルキンが小さな化学構造を有するため、タンパク質等の機能を損なうことなく生体分子をラベルできる利点があるが、反応速度が十分ではないという課題がある[45,47]。一方、IEDDA 反応は、副生成物が窒素 (N₂) のみであるうえ、水系溶媒中でも高い反応選択性で進行し、SPAAC と比較して 1000 倍以上大きな反応速度定数を示す[45,48,49]ため、上述の生体直交型反応を生体応用する際に求められる条件を概ね満たす最も強力な反応として期待されている。これら生体直交型反応を用いた創薬戦略としては、がん等の病変部位への特異的な薬物送達を目的として、先に特定の官能基を有する分子を病変部位に送達し、その後、それと直交反応しうる官能基を持つ薬剤を集積させるという手法が主に用いられている。ここ 20 年の間に細胞表面や核酸のラベリング[50–53]、がんを標的とした核医学診断・治療[54–57]、プロドラッグの活性化[58–61]等に応用されており、その有用性が示されつつある。

以上のような背景により、著者は、生体直交型反応を利用したリポソーム製剤からの薬物放出制御法の開発を着想した。すなわち、リポソーム膜で生体直交型反応を起こし、構成成分の分子構造を変化させることができれば、それに伴った膜特性の変化が誘導され、内封薬物の放出促進が達成されるのではないかと考えた。製剤設計としては、生体直交型反応を起こしうる化合物の組み合わせの一方の化合物をリポソームの構成成分として組み込み、そこにもう一方の化合物と化学反応させることで内封薬物の放出を促進するというものである (Fig. 3)。生体直交型反応には、テトラジン (tetrazine, Tz) とノルボルネン (norbornene, NB) の IEDDA 反応を選択した。Tz は比較的水溶性が高く、様々な構造修飾体が報告されている[53,56,62,63]ことから、両親媒性分子として誘導体

化し、リポソーム膜に導入可能であると考えた。また NB は、Tz との比較的高い反応性を示し[64]、生体内での安定性が高い[65,66]ことから、生体内での化学反応の進行が可能であると考えた。本論では、生体直交型反応を利用した薬物放出促進型リポソーム製剤の開発に向けて、まず、第 1 章では、両親媒性 Tz 誘導体の合成を行い、次にこれを構成成分とするリポソームを調製し、IEDDA 反応に基づく薬物放出挙動について評価を行った。また、化学反応前後のリポソーム膜の特性変化に対して、Langmuir 単分子膜を用いた物理化学的なアプローチによって評価した。第 2 章では、本薬物放出促進法がインビボで機能するか評価し、さらになん治療に有効であるかを検証した。

以下、これらの結果について詳述する。

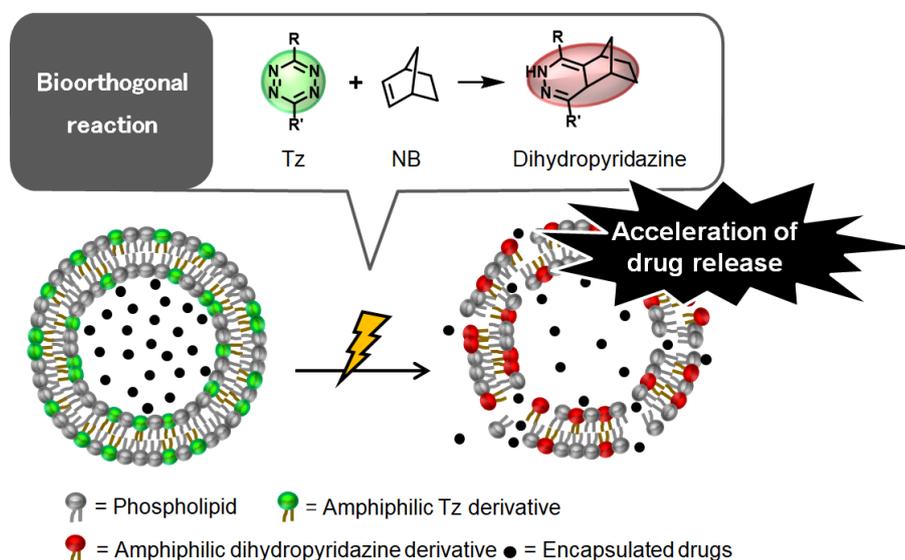


Fig. 3 A strategy for releasing drug from liposome where the membrane structure could be disrupted by reaction between NB and Tz derivative introduced into the liposome as a membrane component.

本論

第 1 章 両親媒性 Tz 誘導体の合成とリポソームへの応用

1-1 緒言

Tz は、4 つの窒素原子を有するヘテロ 6 員環化合物であり、特定のジェノフィルと迅速な IEDDA 反応を起こす。本反応は、夾雑な生体環境でも特異的に進行し、生体直交型反応やクリックケミストリーと呼ばれている[45]。安定な反応生成物を高効率で形成し、かつ副生成物は無毒性の窒素 (N_2) のみであるため、材料工学分野[67,68]や生命科学分野[45,52,54,69]において高い注目を集めている。そこで、本研究においては、本化学反応をリポソーム膜で進行させることでリポソーム膜の特性に変化をもたらし、それに伴って内封薬物の放出を制御しうる新たな薬物放出制御法の構築を目指した。

生体直交型反応を起こしうるリポソームを設計するにあたり、Tz 化合物を両親媒性化合物へと誘導体化し、リポソームに導入することとした。Tz 誘導体(化合物 **1**、Fig. 1-1)の分子設計では、生体内での Tz 骨格の安定性を高め、ジェノフィルとの反応性を向上させることが可能な π 欠如系芳香族複素環化合物であるピリジンを 1,2,4,5-tetrazine の 3,6 位に組み込んだ[62,70,71]。さらに、リポソームの疎水性領域との相互作用を高めるために飽和アルキル鎖を導入した。一方、化合物 **1** と化学反応を起こすジェノフィルには NB 誘導体 (2-norbornene (2-NB)、5-norbornene-2-carboxylic acid (NBCOOH)、5-norbornene-2,3-dicarboxylic acid (NB(COOH)₂) (Fig. 1-2) を選択した。NB は生体内での安定性が高く、化合物 **1** との高い反応性を有する[64–66]。

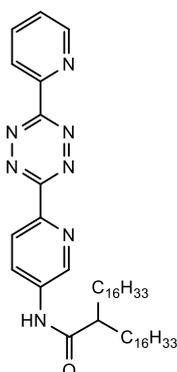


Fig. 1-1 Chemical structure of Tz derivative (**1**).

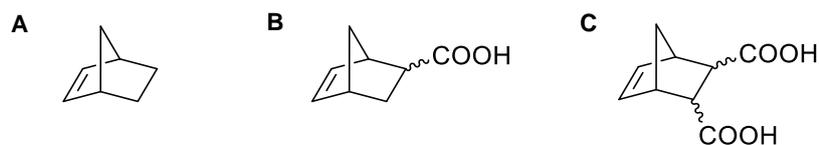


Fig. 1-2 Chemical structure of NB derivatives. (A) 2-NB, (B) NBCOOH, (C) NB(COOH)₂.

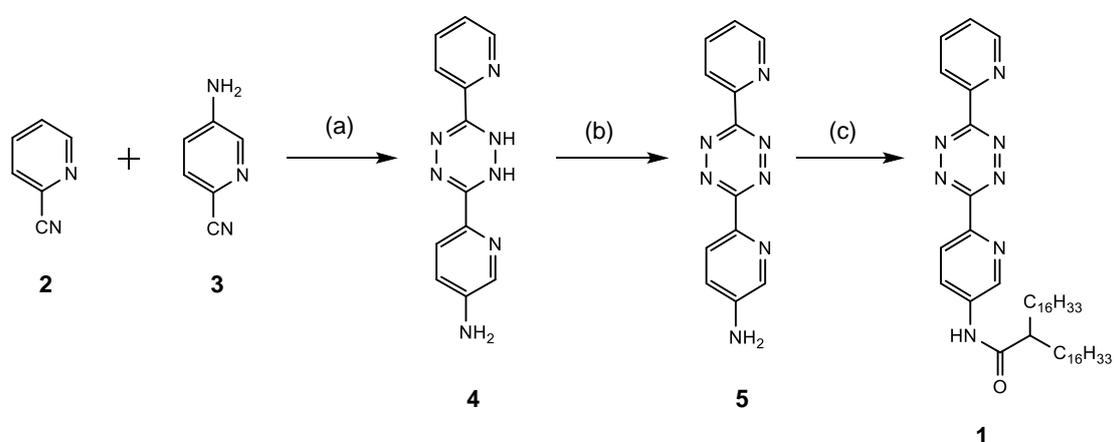
化合物 **1** を導入するリポソームは、膜構成成分と化合物 **1** の相互作用等を明らかにするために単純な脂質組成で調製した。リン脂質にはゲル液晶相転移温度 (critical temperature, T_c) [72] が約 -2°C で取り扱いが容易な 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) を用いた。また、モデル薬物として蛍光色素であるインドシアニングリーン (ICG) や、放射性インジウム錯体 (Indium-111-labeled diethylenetriaminopentaacetic acid, ¹¹¹In-DTPA) を内封し、リポソームからの薬物放出について定性的、定量的に評価した。

一方、Langmuir 単分子膜を用いた界面化学的見地からの評価は、複雑な相互作用により成り立っている生命体や DDS キャリアの表面構造を単分子膜として捉え、膜を構成する分子の占有面積 (A) や表面圧 (π)、表面電位の変化量 (ΔV) を測定することで、その分子自身の特性や混合膜の分子間の相互作用について理解することを可能とする [73–77]。化合物 **1** を導入したリポソームにおいても、NB 誘導体との化学反応前後で膜特性の変化が誘導されると考え、Langmuir 単分子膜を用いた熱力学的な解析を実施し、リポソームからの薬物放出に関する制御機構の解明を試みた。

1-2 結果

1-2-1 両親媒性 Tz 誘導体 (化合物 1) の合成

親水基部分の Tz 骨格については、その安定性の改善と NB 誘導体との反応性の向上を目的としてピリジンを修飾した。その上で、リポソームの構成脂質として頻用される 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) のアルキル鎖を模した飽和炭化水素鎖を導入することで疎水性を付与した。化合物 **1** は Scheme 1-1 にしたがって合成し、ピンク色のオイル状化合物を得た。



Scheme 1-1. Synthesis of the amphiphilic compound **1**. (a) Hydrazine (64%), 90°C, 12 h; (b) H₃BO₃, MeOH, H₂O, r.t., overnight; (c) 2-Hexadecyloctadecanoyl chloride, THF, TEA, 70°C, 2 h.

1-2-2 Tz 誘導体と NB 誘導体との反応性の評価

化合物 **1** および **5** の吸光スペクトルを測定すると 2 つの吸収極大波長が観測された (Fig. 1-3A)。320 および 360 nm 付近の吸収極大はピリジン骨格由来のピークであり [78]、535 nm 付近の吸収極大は Tz 骨格由来のピークであると考えられた。そこで、化合物 **1** および **5** と NB 誘導体との反応性を評価するため、Eising らや Knall らの方法 [62,79] を参考に、擬一次反応条件下で 535 nm の吸光度の減衰を測定することで二次反応速度定数 k_2 を算出した。その結果、化合物 **1** と 2-NB との k_2 は $0.15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、NBCOOH との k_2 は $0.04 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった (Fig. 1-3B)。また、化合物 **5** と 2-NB との k_2 は $0.03 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、NBCOOH との k_2 は $0.01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった (Fig. 1-3C)。

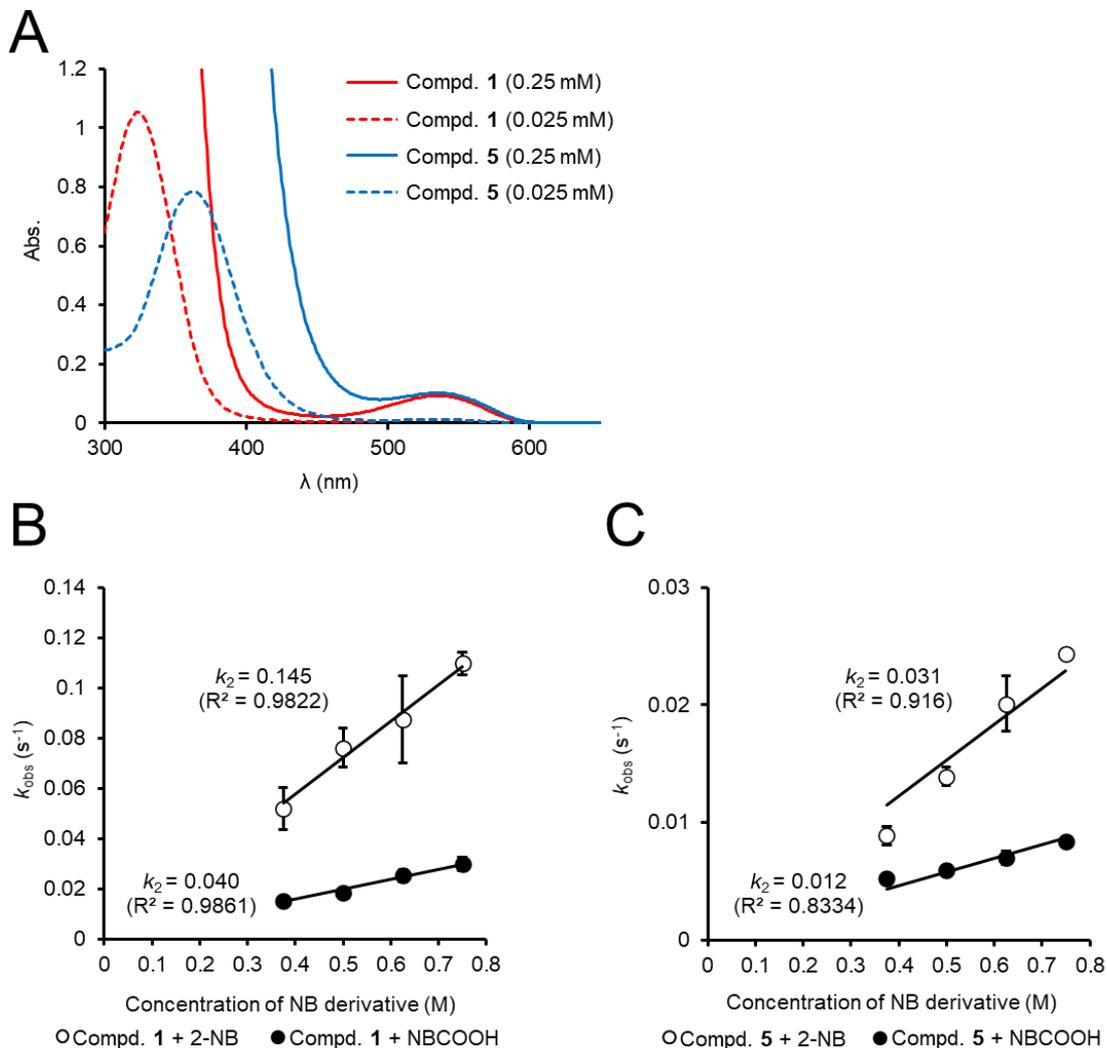


Fig. 1-3 (A) UV-vis absorption spectrum of compound **1** and **5** in different concentrations. (B, C) Linear dependence of pseudo first-order reaction rate constants on the 2-NB and NBCOOH concentration for compound **1** (B) and **5** (C), respectively. Results are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

1-2-3 Tz 誘導体を用いたリポソームの作製

リン脂質であるPOPCと化合物**1**を4:1(mol/mol)で混合させたリポソーム(POTz(4:1)-liposome)を、薄膜水和-凍結融解-押し出し法により作製した。また、化合物**1**はDSPCを模したアルキル鎖を有するため、比較対照としてPOPCとDSPCから成るリポソームを作製した(PODS-liposome)。リポソームにはモデル薬物としてICGを単純水和法により内封した。また、薬物放出の定量的な評価のために $^{111}\text{In-DTPA}$ を配位子交換反応により内封した。ICG内封リポソームの粒子径は約90 nmで、ゼータ電位は $-15 \sim -10$ mV

Table 1-1 The physicochemical properties of liposomes and their encapsulation efficacy of ICG (A) or ^{111}In -DTPA (B), respectively.

(A)

Liposome	Size (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
ICG-PODS-liposome	93.0 ± 5.0	-12.6 ± 0.5	37.5 ± 8.4
ICG-POTz(4:1)-liposome	83.0 ± 4.0	-14.5 ± 0.3	39.3 ± 9.3

(B)

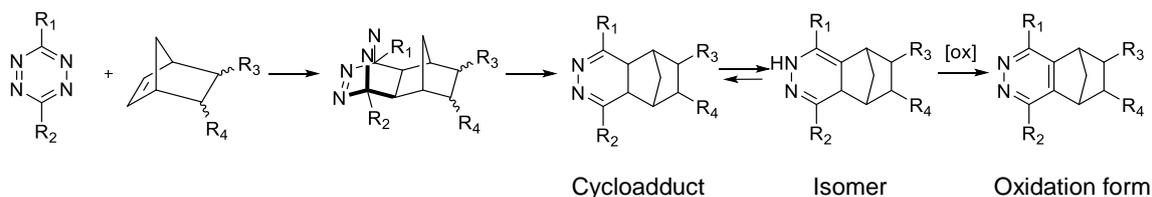
Liposome	Size (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
PODS-liposome	76.3 ± 3.9	-4.6 ± 1.3	
^{111}In -PODS-liposome	83.0 ± 1.5	-2.4 ± 0.7	86.0 ± 1.5
POTz(4:1)-liposome	81.4 ± 1.1	-4.8 ± 1.2	
^{111}In -POTz(4:1)-liposome	84.5 ± 1.7	1.5 ± 2.0	85.8 ± 1.5

Data are expressed as mean ± SD of at least three experiments.

であった (Table 1-1 (A))。 ^{111}In -DTPA 内封リポソームの粒子径は約 85 nm でゼータ電位は -5 ~ 2 mV であり、放射性標識前後で大きく変化しなかった (Table 1-1 (B))。

1-2-4 POTz-liposome と NB 誘導体との化学反応の進行の検証

POTz(4:1)-liposome に NB 誘導体 (2-NB、NBCOOH、NB(COOH)₂) 溶液を混合し、メタノールで可溶化した後に質量分析により評価した。その結果、化合物 **1** と NB 誘導体との反応生成物の分子イオンピークがそれぞれ検出された (2-NB, m/z : calculated for C₅₃H₈₆N₅O [M+H]⁺ 808.6827, found 808.6817; NBCOOH, m/z : calculated for C₅₄H₈₄N₅O₃ [M-H]⁻ 850.6780, found 850.6591; NB(COOH)₂, m/z : calculated for C₅₅H₈₆N₅O₅ [M+H]⁺ 896.6634, found 896.6619)。本化学反応では、縮合反応で生成した化合物と連続して進行した酸化反応による生成物が平衡状態にあり (Scheme 1-2)、2-NB あるいは NBCOOH と反応させた場合、ジヒドロピリダジン化合物からピリダジン化合物となった化合物の分子イオンピークもそれぞれ検出された (2-NB, m/z : calculated for C₅₃H₈₄N₅O [M+H]⁺ 806.6671, found 806.6614; NBCOOH, m/z : calculated for C₅₄H₈₂N₅O₃ [M-H]⁻ 848.6423, found 848.6419)。本検討においては、POTz-liposome と各 NB 誘導体を混合した直後に



Scheme 1-2. Reaction route for IEDDA reaction between Tz and NB derivative.

分析しており、化合物 **1** が NB 誘導体と迅速に反応したことが確認された。

1-2-5 *In vitro* 薬物放出評価

生体直交型反応によるリポソームからの薬物放出を定性的に評価するために、ICG 内封リポソームを用いた検討を実施した (Fig. 1-4)。ICG は濃度消光を起こす性質があり、リポソームに内封された状態であれば局所的に高濃度であるため蛍光が消失し、放出されれば低濃度となり蛍光が回復すると考えられる。実際、メタノールを添加してリポソームを可溶化させると、ICG の蛍光強度は増大した。そこでリポソーム (POPC 終濃度 0.5 mg/mL) と 5% グルコース (Glc) あるいは 2-NB (終濃度 40 mM) を混合して評価した結果、POTz(4:1)-liposome に Glc を添加した場合に、蛍光強度はほとんど変化しなかったことから、リポソームから ICG が漏出していないと考えられた。一方、2-NB を添加すると蛍光強度が顕著に上昇したことから、化合物 **1** と 2-NB との化学反応による薬物放出促進が示唆された。

続いて、リポソームからの薬物放出を定量的に評価するために、 ^{111}In -DTPA 内封リポソームを用いて検討した。各リポソーム (POPC 終濃度 0.1~0.15 mg/mL) と NB 誘導体を混合し、室温で一定時間インキュベーションした後、リポソーム反応溶液をセルロー

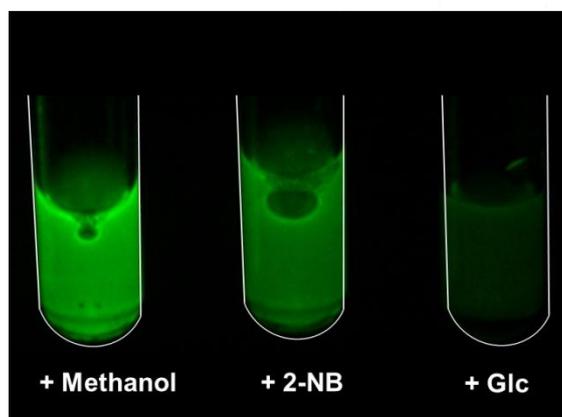


Fig. 1-4 Fluorescence images of POTz(4:1)-liposomes encapsulating ICG immediately after adding methanol (positive control), 2-NB, or Glucose.

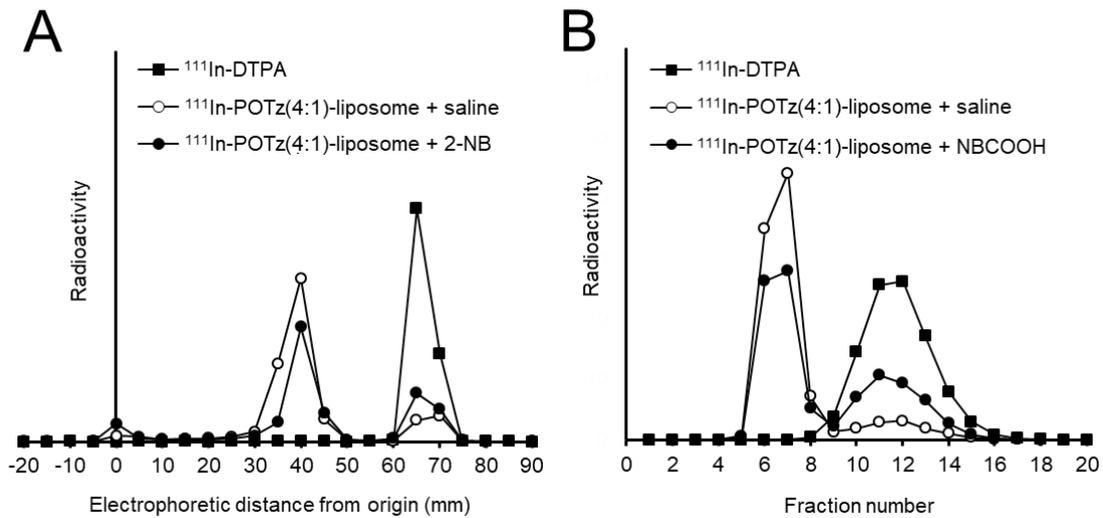


Fig. 1-5 (A) Results of the cellulose acetate membrane electrophoresis of $^{111}\text{In-DTPA}$ and $^{111}\text{In-POTz(4:1)-liposome}$ at 24 h after adding 2-NB or saline. (B) Results of the size-exclusion chromatography of $^{111}\text{In-DTPA}$ and $^{111}\text{In-POTz(4:1)-liposome}$ at 24 h after adding NBCOOH or saline.

スアセテート膜電気泳動法あるいはサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。すなわち、リポソームに内封された $^{111}\text{In-DTPA}$ とリポソームから放出された $^{111}\text{In-DTPA}$ に分画し、放射能に基づき薬物放出率を算出した (Fig. 1-5)。リポソームと混合する NB 誘導体には、2-NB、NBCOOH、NB(COOH)₂、あるいはノルボルナン (NBane) を用いた。なお、NBane は 2-NB の二重結合を還元した化合物で、Tz と反応しないため、ネガティブコントロールとして用いた。その結果、PODS-liposome および POTz(4:1)-liposome に 2-NB (終濃度 40 mM) を加えた直後の放出率は、それぞれ 2.6% および 5.2% であり、薬物放出が促進される傾向が見られた。さらに、2-NB (40 mM) と混合させた 24 時間後では、PODS-liposome からの放出率は 6.9% であったのに対し、POTz(4:1)-liposome では 21.0% と有意に高い値を示した (Fig. 1-6A)。一方、POTz(4:1)-liposome に NBane (40 mM) を添加した場合には、24 時間後の放出率は低かった (5.9%)。さらに、NB 誘導体 (20 mM) の種類による薬物放出性について比較すると、POTz(4:1)-liposome に NBCOOH や NB(COOH)₂ を添加した直後では、薬物放出率はそれぞれ 23% と 11% であり、2-NB を添加した場合に対し有意に高い値を示した (Fig. 1-6B)。24 時間後においては、それぞれ 81%、23% と顕著に高い値を示した。また、この薬物放出率は、POTz-liposome を構成する化合物 **1** の割合や、混合する NB 誘導体の濃度を高くすれば増大する傾向が見られた (Fig. 1-6C and 1-6D)。したがって、POTz-liposome からの薬物放出促進には、

化合物 **1** と NB 誘導体との化学反応は必須であり、3 種の NB 誘導体の中では NB COOH との反応が最も迅速かつ顕著な薬物放出の促進を引き起こすことが明らかになった。

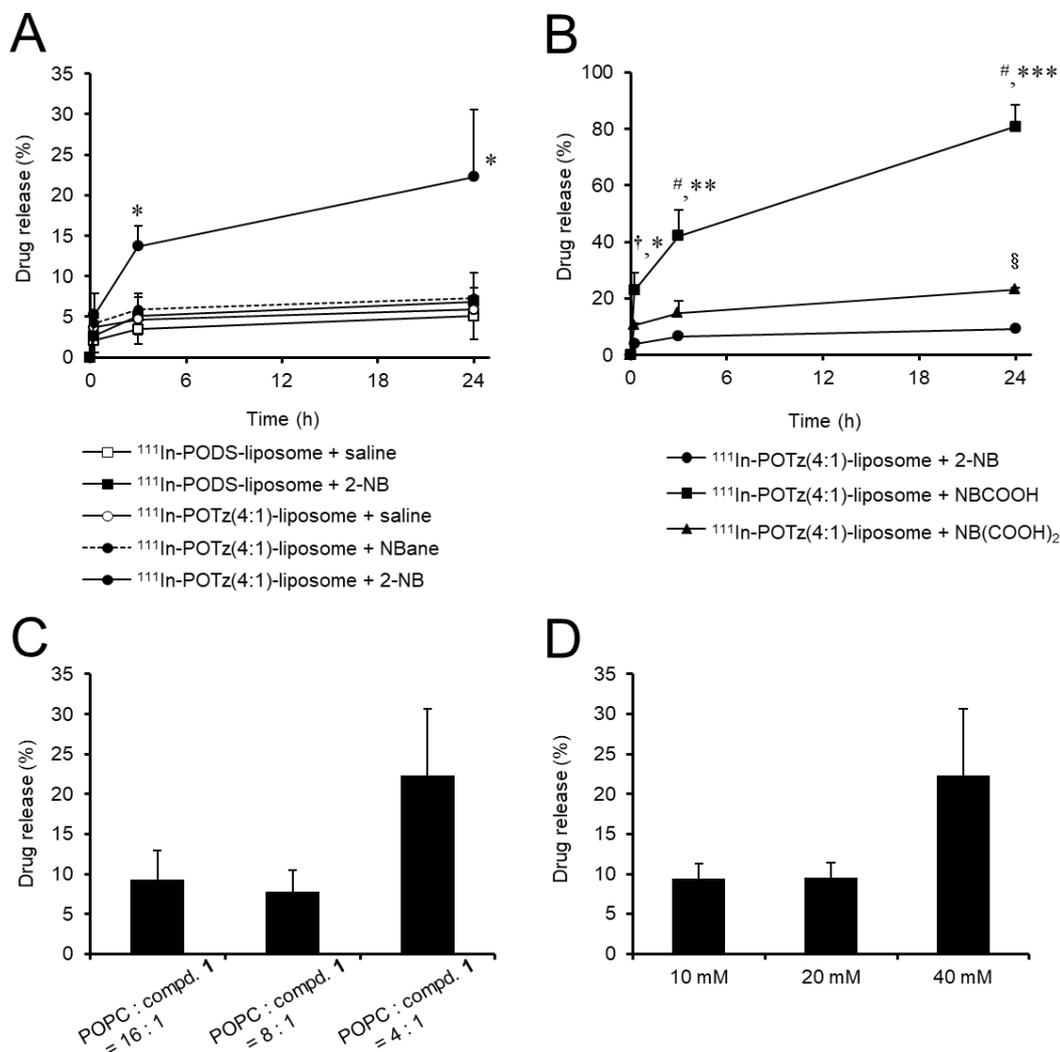


Fig. 1-6 *In vitro* drug release from POTz-liposome and PODS-liposome in presence of 2-NB, NB COOH , NB(COOH) $_2$, NBane or saline. (A) Release rate of ^{111}In -DTPA (%) from liposomes in presence of 2-NB (40 mM) or NBane (40 mM, negative control). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05 vs. PODS-liposome + 2-NB and POTz(4:1)-liposome + saline. (B) Release rate of ^{111}In -DTPA (%) from POTz(4:1)-liposome reacted with 2-NB (20 mM), NB COOH (20 mM), or NB(COOH) $_2$ (20 mM). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). # p < 0.001, $^\dagger p$ < 0.01, $^\ddagger p$ < 0.05 vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB, *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05 vs. POTz(4:1)-liposome + NB(COOH) $_2$. (C) Release rate of ^{111}In -DTPA (%) from POTz-liposomes (POPC:compd. **1** = 16:1, 8:1, and 4:1) at 24 h after reaction with 2-NB (40 mM). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). (D) Release rate of ^{111}In -DTPA (%) from POTz(4:1)-liposome at 24 h after incubation with various concentrations of 2-NB (10, 20, and 40 mM). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).

1-2-6 蛍光色素を用いたリポソームの膜流動性の評価

リポソームに内封された薬物の放出挙動を律する要因の一つに膜の流動性がある[80]。そこで、化学反応前後におけるリポソーム膜の流動性を評価することで、化学反応による薬物放出制御メカニズムの解明に繋がると考えた。流動性の評価には、環境応答性の蛍光色素である 6-decanoyl-2-dimethylaminonaphthalene (Laurdan) を用いた。Laurdan は脂質膜の流動性の違いにより異なる蛍光スペクトルを示し、流動性が低いと 440 nm に蛍光極大を示す一方で、流動性が高くなると 490 nm の蛍光強度が増大する (Fig. 1-7A)。440 nm と 490 nm の蛍光強度から算出される generalized polarization (GP 値) により、流動性が評価される[81]。なお、GP 値は大きければ流動性は低く、小さければ流動性が高いことを示す。Laurdan を内封したリポソーム (POPC 終濃度 0.05~0.1 mg/mL) と 2-NB (終濃度 40 mM) を混合して評価した結果、PODS-liposome では、生理食塩水や 2-NB との混合前後で GP 値に大きな変化は見られなかった (Fig. 1-7B)。一方、POTz(4:1)-liposome と 2-NB との混合直後に GP 値は顕著に低下することが明らかとなった。その後、時間の経過とともに GP 値は回復する傾向を示し、一時的に不安定化した膜が経時的に安定化することが示唆された。POTz(4:1)-liposome と NBCOOH との混合前後では、GP 値に大きな変化は見られず、薬物の放出促進効果と一致しなかった。なお、POTz(4:1)-liposome と生理食塩水や NBane (40 mM) とを混合させた前後では、GP 値に大きな変化は見られなかった。さらに、POTz-liposome と 2-NB との化学反応において、POTz-liposome を構成する化合物 **1** の割合や、POTz(4:1)-liposome と混合する 2-NB 濃度を高くするにつれて GP 値が低下した (Fig. 1-7C and 1-7D)。以上のことから、化合物 **1** と 2-NB との化学反応により、POTz-liposome の膜流動性が向上したことが薬物放出促進の要因の一つである可能性が示された。

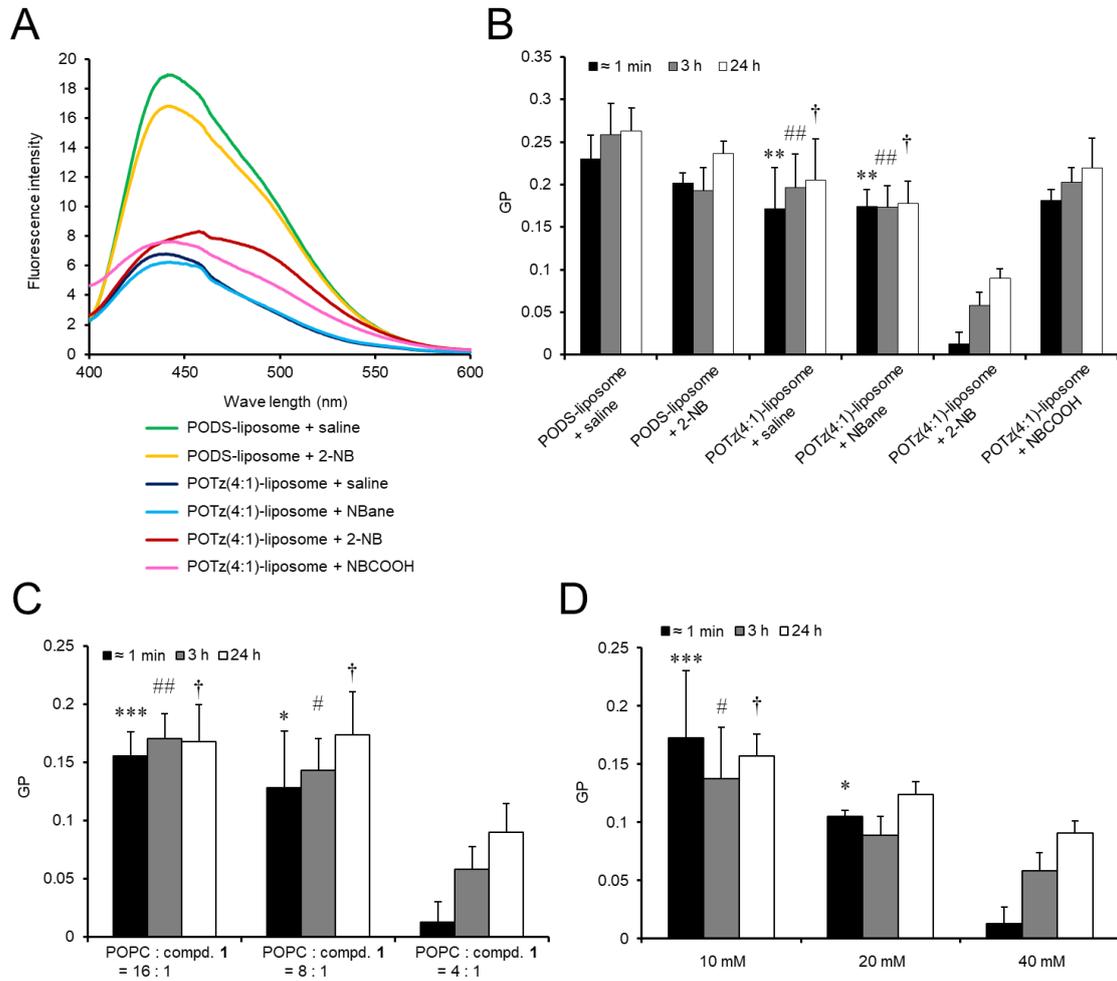


Fig. 1-7 (A) Representative Laurdan emission spectra in PODS-liposome and POTz(4:1)-liposome at an excitation wavelength of 340 nm immediately (≈ 1 min) after adding 2-NB, NBCCOOH, NBane, or saline. (B) Laurdan GP values of PODS-liposome and POTz(4:1)-liposome after adding 2-NB, NBCCOOH, NBane, or saline. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$). $**p < 0.01$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB at ≈ 1 min group. $##p < 0.01$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB at 3 h group. $\dagger p < 0.05$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB at 24 h group. (C) Laurdan GP values of POTz-liposome (POPC:compd. **1** = 16:1, 8:1, and 4:1) after adding 2-NB (40 mM). Data are expressed as mean \pm SD. ($n = 3$). $***p < 0.001$, $*p < 0.05$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB at ≈ 1 min group. $##p < 0.01$, $\#p < 0.05$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB at 3 h group. $\dagger p < 0.05$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB at 24 h group. (D) Laurdan GP values of POTz(4:1)-liposome after adding 2-NB (10, 20, and 40 mM). Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). $***p < 0.001$, $*p < 0.05$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB (40 mM) at ≈ 1 min group. $\#p < 0.05$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB (40 mM) at 3 h group. $\dagger p < 0.05$ vs. POTz(4:1)-liposome + 2-NB (40 mM) at 24 h group.

1-2-7 単分子膜を用いた表面圧-分子（占有）面積、表面電位-分子面積についての評価

界面活性剤の特性について評価できる Langmuir 単分子膜を用いて、化学反応前後における膜物性の変化（表面圧-分子面積（ π - A 等温線）、表面電位-分子面積（ ΔV - A 等温線））について評価した。Fig. 1-8 に測定装置と測定の様子を表した模式図を示す。単分子膜は気体膜を形成し、圧縮に伴い液体膨張膜、液体凝縮膜へと転移し、最終的には膜崩壊を起こす。 π - A 等温線は、単分子膜を圧縮して、その面積を減少させた時の表面圧変化から求めた。同様に ΔV - A 等温線を面積の減少に伴う表面電位変化から求めた。これらを実験することにより、膜の状態（表面分子密度や分子配向性）を知ることができる。化合物 **1** と各 NB 誘導体（2-NB、NBCOOH、NB(COOH)₂）との反応生成物をそれぞれ compd. **1**-2-NB、compd. **1**-NBCOOH、compd. **1**-NB(COOH)₂ として表す。本検討において、化合物 **1** と NB 誘導体との化学反応は単分子膜の親水基部分で起こるため、膜特性の違いが生じた場合は、親水基部分の変化に由来すると想定される。

まず、POPC、compd. **1**、compd. **1**-2-NB、compd. **1**-NBCOOH、あるいは compd. **1**-NB(COOH)₂ について、単一成分で単分子膜を作製し、それぞれの物理化学的特性について評価した (Fig. 1-9)。その結果、POPC は典型的な液体膨張膜を形成した[82]。POPC の π - A 等温線より、単分子膜が崩壊する時の表面圧 (π^c) は 49.2 mN m⁻¹ であった。一方、化合物 **1** で作製された単分子膜では、液体膨張膜から液体凝縮膜に一次相転移を起こす表面圧 (π^{eq}) が 6.8 mN m⁻¹ で観測された。同様に compd. **1**-NBCOOH や compd. **1**-NB(COOH)₂ で作製された単分子膜においても、それぞれ 25.0 mN m⁻¹ と 27.8 mN m⁻¹ で π^{eq} が観測された。 π^{eq} は、測定温度が上昇するにつれて増大したことから、一次相転移点

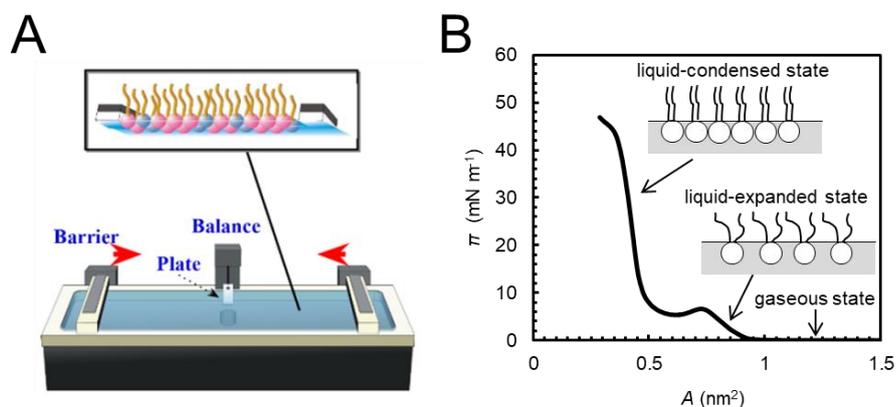


Fig. 1-8 Illustration of instrument for evaluating Langmuir monolayer properties (A) and π - A isotherm (B).

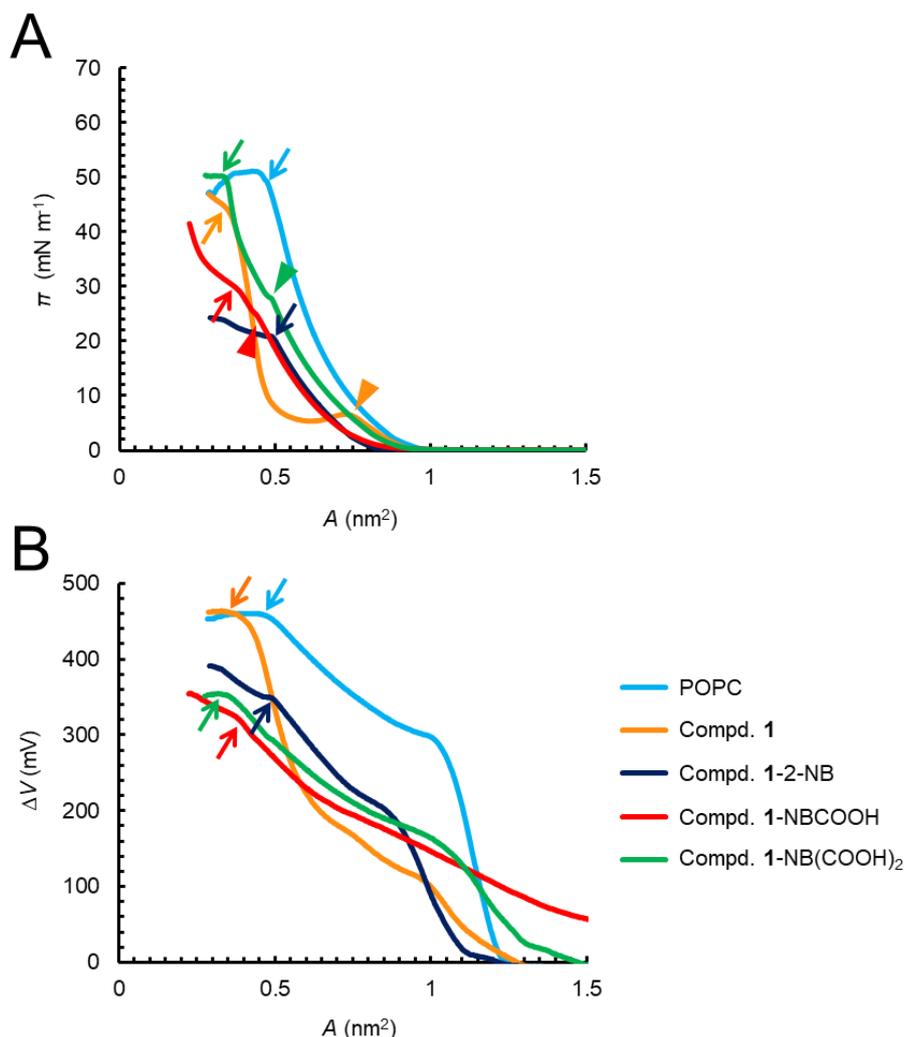


Fig. 1-9 The π - A (A) and ΔV - A (B) isotherms of one-component POPC, compd. **1**, compd. **1-2-NB**, compd. **1-NBCOOH**, and compd. **1-NB(COOH)₂** monolayers on 150 mM NaCl aq. at 25°C. Arrowheads and arrows indicate the phase transition (π^{td}) and monolayer collapse (π^c), respectively.

であることが示された (Fig. 1-10)。化合物 **1** の π^c 値は、42.0 mN m⁻¹ を示し、POPC と同程度であった。 π^c 値における A 値は、POPC から成る単分子膜の方が化合物 **1** から成る単分子膜よりも高値を示した。これは、POPC が疎水基部分に不飽和アルキル鎖を有しており、その立体障害が単分子膜の配向性に影響したためであると推察された。一方、compd. **1-2-NB** や compd. **1-NBCOOH** で作製された単分子膜の π^c 値は、それぞれ 20.7 mN m⁻¹ と 29.2 mN m⁻¹ となり、化合物 **1** や POPC の π^c 値よりも著しく低値を示した。したがって、化合物 **1** が NB 誘導体と反応することにより、親水基部分の凝縮力が低下し、それに伴い、リポソーム膜の不安定化に繋がること示唆された。加えて、 ΔV - A 等温線

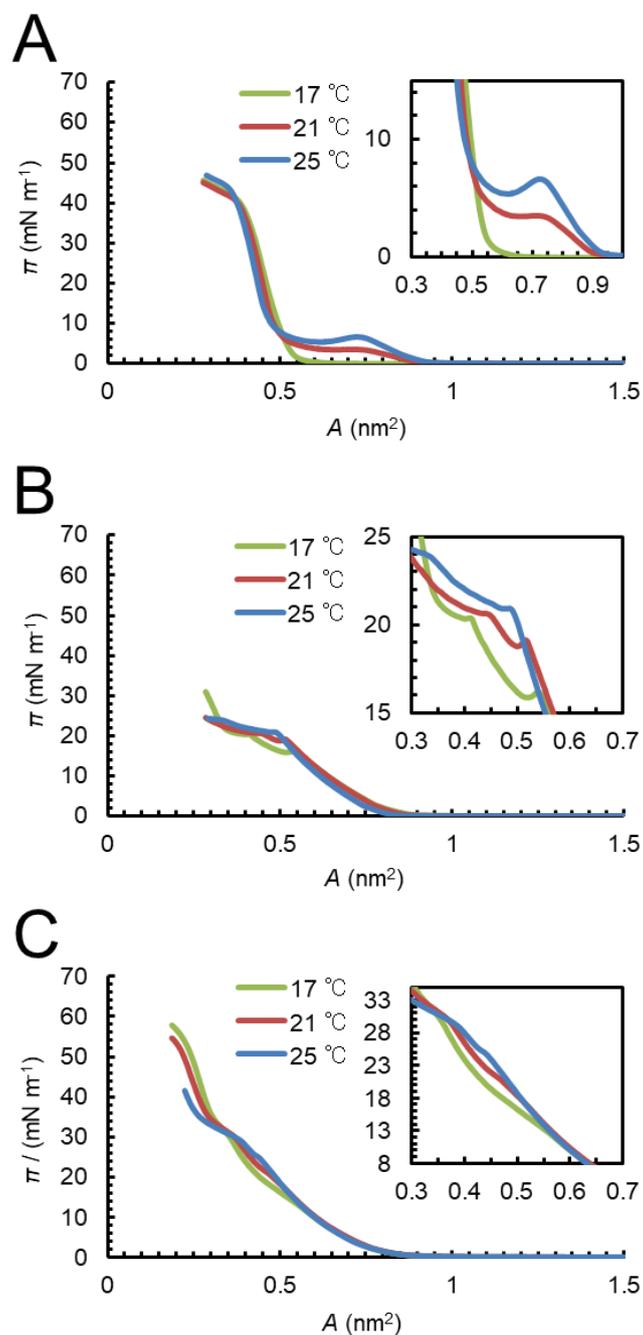


Fig. 1-10 The π - A isotherms of one-component compd. **1** (A), compd. **1-NBCOOH** (B) and compd. **1-NB(COOH)₂** (C) monolayers on 150 mM NaCl aq. at 17, 21, and 25°C, respectively.

について解析した結果、POPC や化合物 **1** で作製された単分子膜の ΔV の最大値（最も膜が凝集した状態）が、それぞれ 457 mV や 461 mV であったのに対し、化学反応後の生成物（compd. **1-2-NB**、compd. **1-NBCOOH**、compd. **1-NB(COOH)₂**）で作製された単分

子膜では、それぞれ 348 mV、321 mV、351 mV と顕著に低い値を示した (Fig. 1-9B)。この単分子膜の圧縮に伴う ΔV 値の低下は、親水基部分の構造の違いにより生じる疎水基部分の配向性の違いを反映するものと考えられた。

続いて、リポソームの構成脂質である POPC と各化合物 (compd. **1**、compd. **1-2-NB**、compd. **1-NBCOOH**、compd. **1-NB(COOH)₂**) を 4 : 1 (mol/mol) で混和して作製した単分子膜を用いて、二成分系で膜特性について評価した。この評価により、NB 誘導体と反応する前後の化合物 **1** と POPC との側方方向に関する分子間相互作用を解析することで、リポソームからの薬物放出促進機構を明らかにできると考えた。二成分系の単分子膜を用いて評価した結果、POPC/compd. **1** から成る単分子膜の π -A 等温線は、POPC と同等であったのに対し、POPC/compd. **1-2-NB**、POPC/compd. **1-NBCOOH** から成る単分子膜では異なる等温線を示した (Fig. 1-11A)。これにより、化合物 **1** と 2-NB や NBCOOH との化学反応後に POPC との相互作用が変化したことが考えられた。 π 値について、POPC/compd. **1** の単分子膜では 51.3 mN m^{-1} であったのに対し、化学反応後 (POPC/compd. **1-2-NB**、POPC/compd. **1-NBCOOH**、POPC/compd. **1-NB(COOH)₂**) では、それぞれ 50.5 mN m^{-1} 、 50.4 mN m^{-1} 、 48.8 mN m^{-1} とわずかに低値を示した (Fig. 1-11A)。一方、 ΔV の最大値は、化学反応により大きく変化し、POPC/compd. **1-2-NB** (418 mV) > POPC/compd. **1-NBCOOH** (390 mV) (\approx POPC/compd. **1**) > POPC/compd. **1-NB(COOH)₂** (357 mV) となった (Fig. 1-11B)。これにより、二成分系の単分子膜で起こる分子間相互作用の変化は、POPC と化合物 **1** や化学反応により生成した化合物の構造に起因することが示唆された。また、単分子膜の充填状態や表面密度の変化には、膜流動性の変化や構成分子間の力学的な相互作用が関与している可能性が考えられるため、以降にて、膜の流動性に相関する圧縮率 (compressibility modulus, Cs) や混合による過剰ギブズ自由エネルギーの変化量 (ΔG_{mix}^{exc}) について評価を行った。

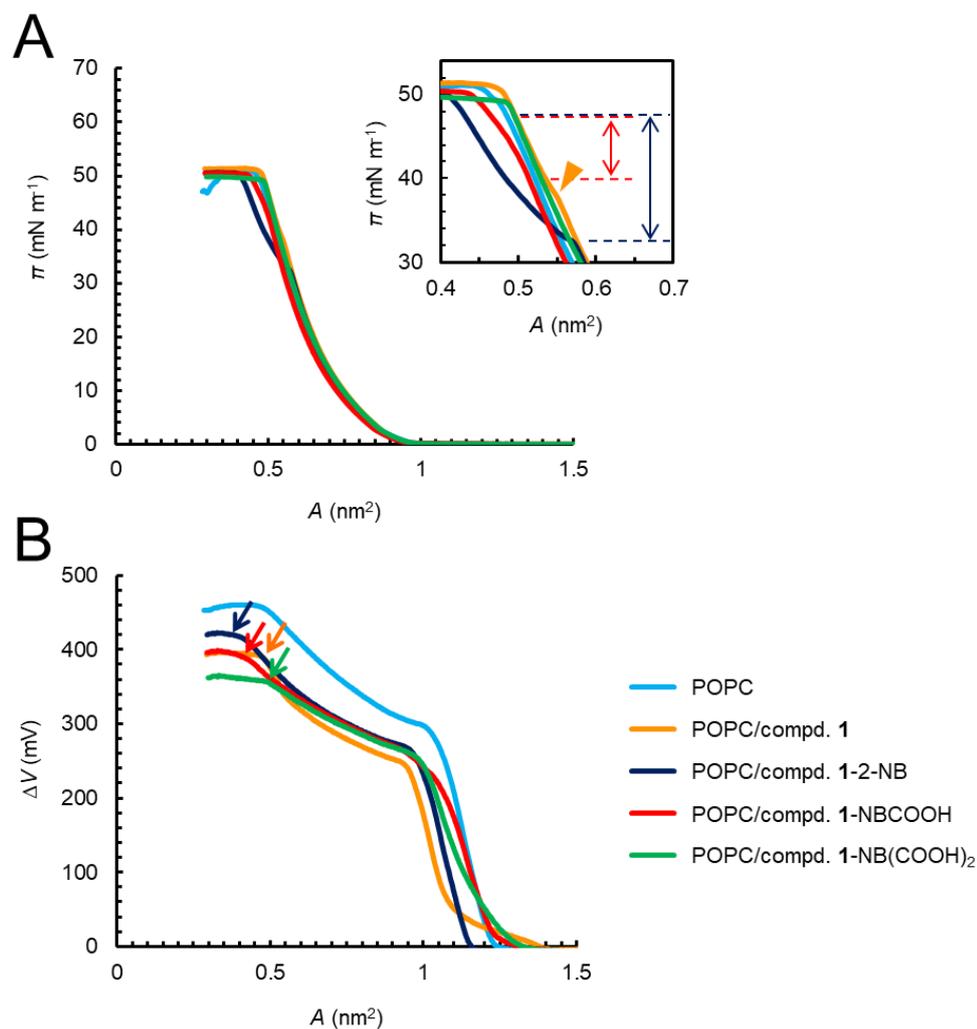


Fig. 1-11 The π - A (A) and ΔV - A (B) isotherms of one-component POPC, binary POPC/compd. **1**, POPC/compd. **1**-2-NB, POPC/compd. **1**-NBCOOH, and POPC/compd. **1**-NB(COOH)₂ monolayers (POPC:compd. **1**-NB derivatives = 4:1 molar ratio) on 150 mM NaCl aq. at 25°C. Arrowheads and arrows indicate the phase transition (π^{eq}) and monolayer collapse (π^c), respectively. The double-headed arrows indicate the kink on the π - A isotherms.

1-2-8 単分子膜の流動性に関する評価

単分子膜の流動性は、圧縮率 (C_s) の逆数 (C_s^{-1}) を指標に評価される。 C_s^{-1} は、 π -A 等温線を微分することで算出され、単分子膜が圧縮される過程を反映する。側方方向からの圧縮に対し、緩やかな π の増大が観察される膜は、凝縮力が小さく柔らかい膜を形成しているため流動性が高いと言える。すなわち、 C_s^{-1} 値が小さければ、膜流動性が高いことを表す。まず、Fig. 1-12A に一成分系で各化合物の膜の流動性を評価した結果を示す。化合物 **1** から成る単分子膜の C_s^{-1} 値は、化学反応後の化合物 (compd. **1-2-NB**、compd. **1-NBCOOH**、compd. **1-NB(COOH)₂**) から成る単分子膜よりも大きな値を示した。したがって、化合物 **1** は化学反応により生成した化合物よりも剛直な膜を形成することが明らかとなった。続いて、二成分系の単分子膜を用いて評価した結果 (Fig. 1-12B)、POPC/compd. **1** や POPC/compd. **1-NB(COOH)₂** で作製された単分子膜と比較して POPC/compd. **1-2-NB** や POPC/compd. **1-NBCOOH** の単分子膜では、表面圧の範囲がそれぞれ $33\sim 47\text{ mN m}^{-1}$ 、 $40\sim 47\text{ mN m}^{-1}$ の範囲で低い C_s^{-1} 値を示し、流動性の増大を認めた。POPC/compd. **1-2-NB** で流動性の増大が見られたことは、1-2-6 での Laurdan を用いた検討結果と同様であった。一方、POPC/compd. **1-NB(COOH)₂** の単分子膜における C_s^{-1} 値は、POPC/compd. **1** の単分子膜と大きく変わらなかった。以上の結果より、化学反応による流動性の向上がリポソームからの薬物放出促進の駆動力の 1 つとなることが明らかとなったと同時に、膜流動性の増大効果とリポソームからの薬物放出促進効果に必ずしも相関が見られなかったことから、流動性だけでなく他の要因が放出促進に関与している可能性が考えられた。

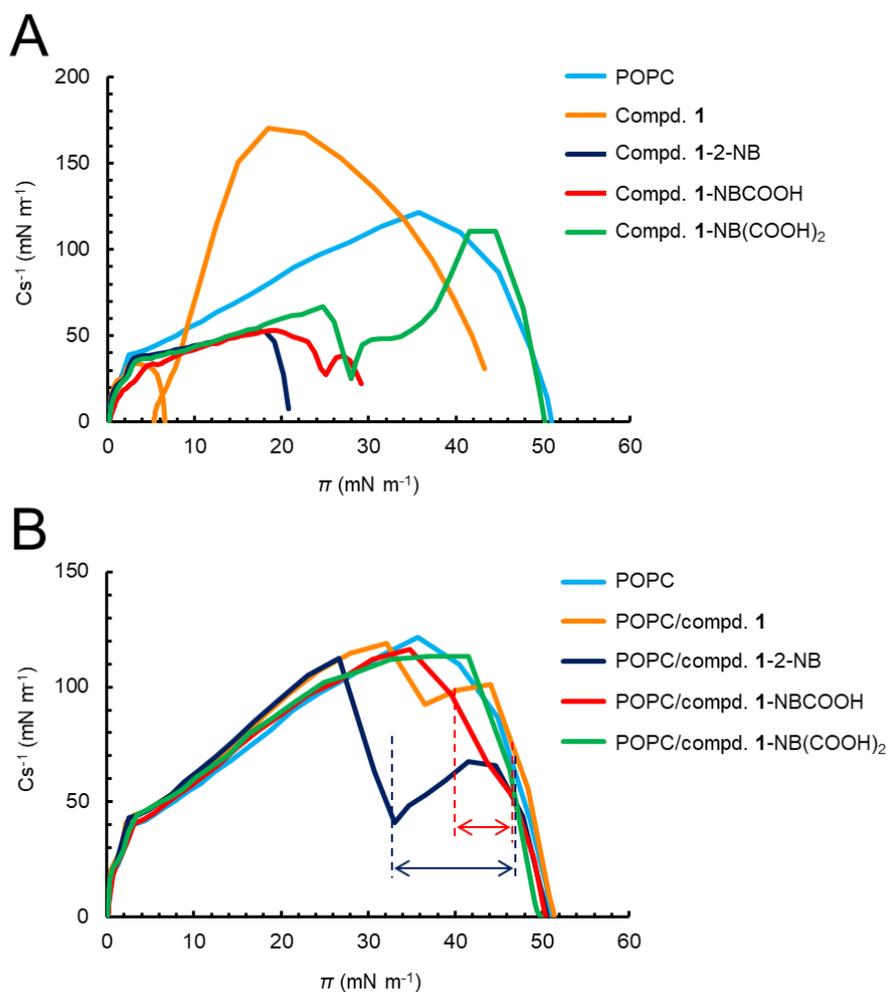


Fig. 1-12 The compressibility modulus (C_s^{-1}) of the one-component (POPC, compd. 1, compd. 1-NB, compd. 1-NBCOOH, and compd. 1-NB(COOH)₂) monolayers (A) and two-component (POPC/compd. 1, POPC/compd. 1-2-NB, POPC/compd. 1-NBCOOH, and POPC/compd. 1-NB(COOH)₂) monolayers (B) on 150 mM NaCl aq. at 25°C as a function of π . The double-headed arrows, which correspond to those in Fig. 1-11A, indicate the regions of π where membrane fluidity increased (POPC/compd. 1-2-NB and POPC/compd. 1-NBCOOH).

1-2-9 単分子膜における混合による過剰ギブズ自由エネルギーの変化量に関する評価

単分子膜を構成する分子間の相互作用を熱力学的に解析するために、 π - A 等温線から ΔG_{mix}^{exc} を算出した。この値は、膜成分の A 値にモル分率を乗じた値の和を実際に二成分系単分子膜で測定された A 値から減算し、 π 値の範囲で積分することで求まる。 ΔG_{mix}^{exc} が正の値であれば、実際の二成分系単分子膜の π 値が理想混合膜の π 値よりも大きく、両成分間に斥力が作用していることを表す一方で、負の値であれば、両成分間に引力が作用していることを表す。また、値が 0 の場合は、理想混和しているか、全く混和しておらず、両成分間に相互作用が起きていないことを表している。その結果、全ての混合膜において正の ΔG_{mix}^{exc} 値が得られたことから、いずれの二成分系単分子膜においても両成分間で斥力が作用していることが明らかとなった (Fig. 1-13)。 π 値が 10~23 mN m⁻¹ において、各単分子膜の ΔG_{mix}^{exc} 値を比較すると、POPC/compd. 1-NBCOOH < POPC/compd. 1-NB(COOH)₂ < POPC/compd. 1-2-NB < POPC/compd. 1 の順となった。したがって、単分子膜の両成分間に作用する斥力は、化学反応前後で低下することが明らかとなった。特に POPC/compd. 1-NBCOOH の単分子膜において、 ΔG_{mix}^{exc} 値は最も小さな値を示し、斥力が大幅に減弱した。以上の結果は、POTz-liposome からの薬物放出率が NBCOOH 添加時に最も高くなったことと逆相関し、NB 誘導体と化学反応した化合物 1 と POPC の間に作用する斥力の低下もまた、リポソームからの薬物放出促進の 1 つの要因になることが示唆された。

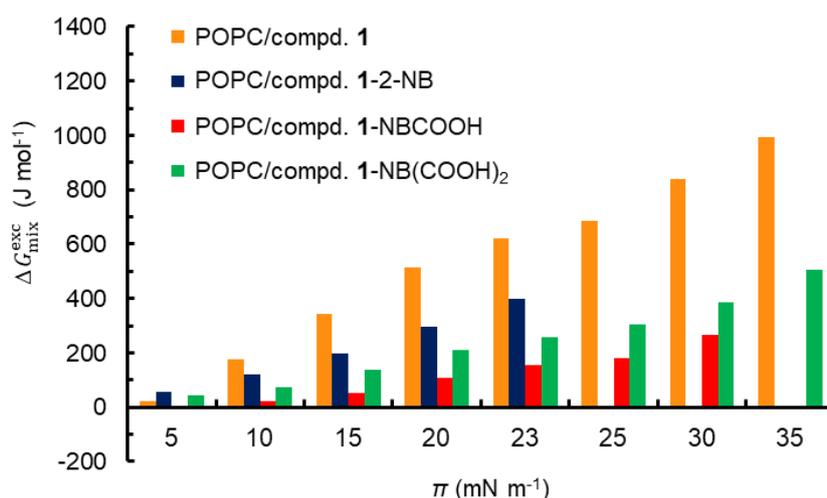


Fig. 1-13 Excess Gibbs free energy of mixing (ΔG_{mix}^{exc}) of two-component (POPC/compd. 1, POPC/compd. 1-2-NB, POPC/compd. 1-NBCOOH, and POPC/compd. 1-NB(COOH)₂) monolayers on 150 mM NaCl aq. at 25°C as a function of π . There is a lack of data for POPC/compd. 1-2-NB and POPC/compd. 1-NBCOOH because ΔG_{mix}^{exc} could not be calculated due to monolayer collapse.

1-3 考察

本研究では、生体直交型反応として Tz と NB との反応が迅速かつ選択的に進行する点に着目し、まずリポソームの構成成分として用いる両親媒性 Tz 誘導体 **1** を新規設計し、合成することに成功した。次に、合成した化合物 **1** および **5** と NB 誘導体の反応性を確認したところ、一般的な SPAAC 反応の反応速度定数と同程度の値を示した[46,83]。化合物 **1** の方が化合物 **5** よりも大きな反応速度定数を示したのは、化合物 **1** でピリジン骨格に電子供与性の低いアミド基が導入されたことに起因すると考えられた[56]。また、NBCOOH が 2-NB よりも小さな反応速度定数を示したのは、電子求引性の高いカルボキシ基により反応性を示す二重結合の電子密度が低下したためであると考えられた[79]。したがって、化合物 **1** と NB 誘導体の二次反応速度定数が比較的大きな値であったことから、本研究においても *in vivo* で生体直交型反応を進行させることができるのではないかと期待された。

リポソームからの薬物放出に関しては、POTz(4:1)-liposome に NB 誘導体を混合した場合においてのみ、顕著な薬物放出を示した。このことから、リポソームからの薬物放出促進が化合物 **1** と NB 誘導体との化学反応に起因していることが示唆された。種々の NB 誘導体の中でも、NBCOOH は POTz(4:1)-liposome と混合した直後から薬物放出が増大し、最も薬物放出促進効果が高かった。一方、NB 骨格内のカルボキシ基が薬物放出に関与していると考え、2つのカルボキシ基を有する NB(COOH)₂ を用いて検討したが、放出促進効果が劇的に改善されることはなかった。実際、Langmuir 単分子膜を用いた評価により、化合物 **1** と NB(COOH)₂ との化学反応前後でリポソーム膜の流動性に大きな変化は認められなかった。一方、compd. **1**-2-NB や compd. **1**-NBCOOH で作製された単分子膜を用いた場合、膜流動性の増大および膜構成成分の相互作用に変化を認めた。特にこれらの π 値は、化合物 **1** や POPC 単独の π よりも低い値を示したが、これは、化学反応により生成した化合物が側方方向からの力に対して弱いことを意味しており、化学反応により膜の不安定化が誘導されたと考えられた。一方、compd. **1**-NB(COOH)₂ の π 値は compd. **1**-2-NB や compd. **1**-NBCOOH よりも高かったが、これは2つのカルボキシ基が下相液 (150 mM NaCl 水溶液) の水分子と水素結合を形成したために、膜が安定化した可能性が考えられた。本研究において膜の流動性に関しては、Laurdan を用いる方法と Langmuir 単分子膜を用いる方法の二通りの手法で評価した。Laurdan を用いた検討では、化学反応の進行具合やその後の膜の再構築等が反映される結果が得られた一

方で、Langmuir 単分子膜を用いた検討においては、予め化学反応を起こした compd. 1-NB 誘導体を用いて評価するため、化学反応に基づく動的な特性変化を反映しているわけではない。それゆえ、化学反応直後の膜特性変化については現在のところ不明である。今後は、脂質膜上で化学反応を起こし、経時的な変化を測定していく評価系の構築が望まれる。また、Karve らは、pH に応答して生じる膜構成分子間の斥力低下を利用して内封薬物の放出を引き起こすリポソーム製剤を報告している[15]。このリポソーム膜は、その構成成分の分子間に斥力が働くことで均質な状態を維持するが、pH の変化に伴う斥力の低減が膜の相分離を誘導し、それが薬物の放出を促進したと考えられている[84]。本検討においても、POTz-liposome からの薬物放出には、分子間斥力の低減が寄与すると考えられたことから、リポソーム膜に相分離が生じている可能性が考えられた (Fig. 1-14)。

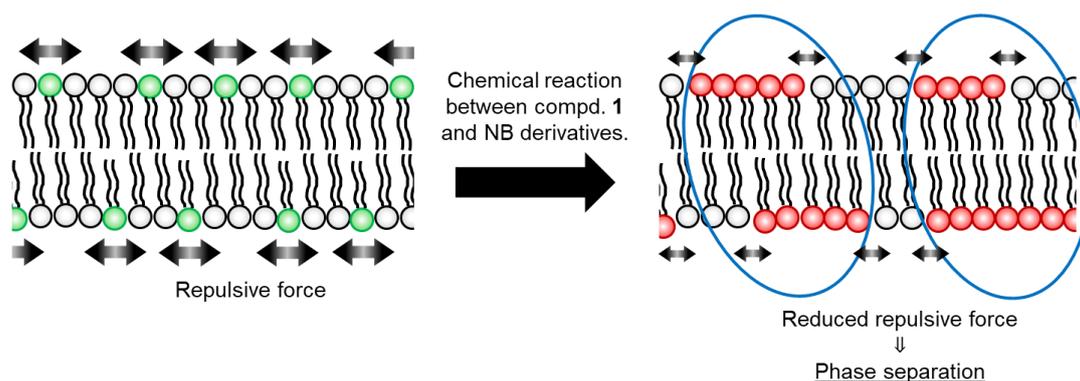


Fig. 1-14 Proposed diagram of phase separation of lipid membrane by reducing the repulsive force between components after the chemical reaction. Blue ellipses indicate phase separation and domain formation.

1-4 小括

- リポソームの構成成分として、両親媒性テトラジン (Tz) 誘導体 **1** を新規に合成した。
- 化合物 **1** を導入したリポソーム (POTz-liposome) は、種々のノルボルネン誘導体 (2-NB、NBCOOH、NB(COOH)₂) と迅速に化学反応を起こした。さらに、その化学反応により POTz-liposome からの内封薬物の放出促進が確認され、化学反応による薬物放出促進法が新たに確立された。特に NBCOOH を反応させた場合、顕著な薬物放出促進を認めた。
- Langmuir 単分子膜を用いた熱力学的解析により、化合物 **1** と NB 誘導体の化学反応により生成した化合物と POPC から成る二成分系単分子膜において、流動性の増大や、構成分子間の斥力の低減が確認された。したがって、化学反応前後の膜特性変化がリポソームからの薬物放出促進の要因となる可能性を明らかとした。

第 2 章 生体直交型反応を介した薬物放出制御型リポソーム製剤に

よるがん治療効果の増強

2-1 緒言

第 1 章では、両親媒性 Tz 誘導体 **1** とリン脂質である POPC から構成されたリポソーム (POTz-liposome) が NB 誘導体と化学反応した場合、*in vitro* においてリポソームからの薬物放出が促進されることを明らかにした。中でも NBCOOH を用いた場合に顕著な薬物放出促進が示された。本章では、新たな薬物放出制御機構を有する本リポソーム製剤をがん治療へと展開し、効果的ながんの薬物治療が可能であるかを検証した。治療戦略としては、Fig. 2-1 に示すように、まず DOX を内封した化合物 **1** 導入リポソームを前投与し、EPR 効果によるがんへの集積と正常組織からのクリアランスを待つ。続いて NB 誘導体を投与することで、リポソーム集積部位でのみ生体直交型反応が進行し、それに伴った DOX の放出促進により治療効果が増強されることを期待する 2 段階の薬剤投与を計画した。

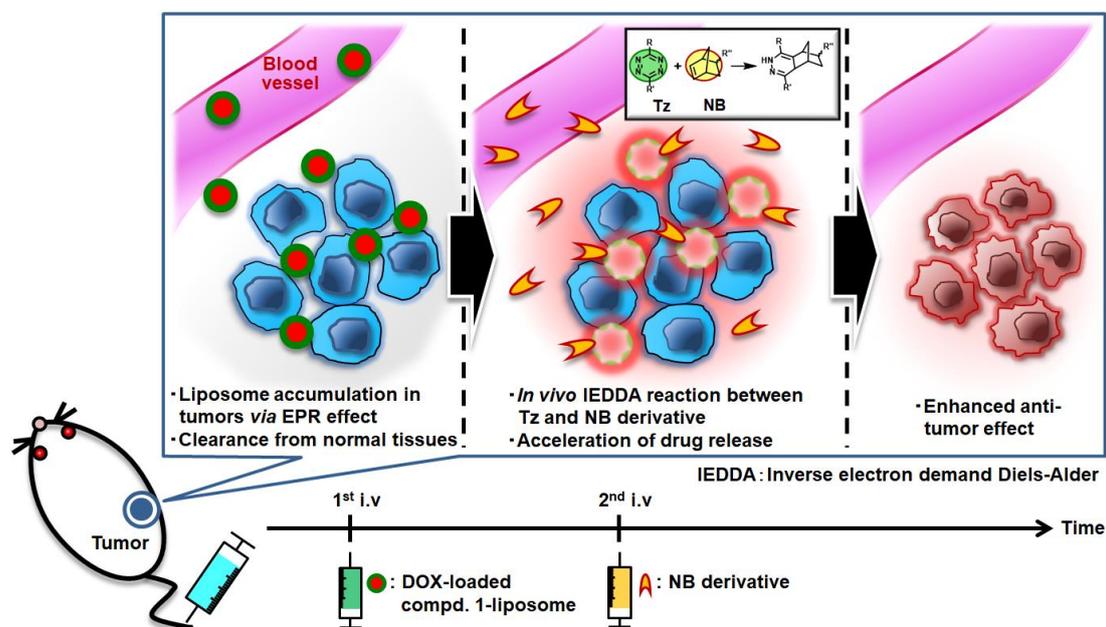


Fig. 2-1 A strategy for tumor chemotherapy using liposomal formulation which could accelerate drug release *via* IEDDA reactions.

本リポソーム製剤を *in vivo* がん治療へと展開する場合、リポソームの生体内での安定性が問題となる。リン脂質は、その種類により異なる Tc を有し、リン脂質二重膜の物質透過性は、ゲル相では極めて低く、液晶相では高いことが知られている。第 1 章で用いた POPC の Tc は約 -2°C であり、非常に柔らかい膜を形成するため、生体内では血漿タンパク質をはじめとする様々な物質との相互作用により、リポソームとして安定に存在することが難しいと予想される。ここで Doxil[®] は、Tc が高い ($50\sim 56^{\circ}\text{C}$) 水素添加大豆リン脂質 (hydrogenated soybean phosphatidylcholine, HSPC) や脂質膜の物理的安定性を高める cholesterol (Chol) [85]、PEG 修飾脂質により構成されているため、生体内でも安定に存在していると考えられている[4]。そこでまず、Doxil[®] の脂質組成を参考に化合物 **1** 導入リポソームを設計した。次に、作製したリポソームについて、第 1 章と同様に NB 誘導体との化学反応により内封薬物の放出制御が可能であるかを検証した。そして、治療評価を行うにあたり、どのような投与タイミングで各薬剤を投与するか決定するために、担がんモデルマウスを用いてリポソームの体内動態評価を行った。さらに、がん組織内において内封薬物の放出が促進されているかについて、水溶性モデル薬物 (¹¹¹In-DTPA)、あるいは細胞内移行性のあるモデル薬物 (DOX) を内封したリポソームを用いて評価した。最後に、本薬物放出促進法ががん治療に有効であるかを検証するために治療実験を実施した。

2-2 結果

2-2-1 リポソームの組成検討

第1章で用いたPOPCから成るリポソームは、*in vivo*において生体の様々な物質との相互作用が起こりうる[5]。実際にPOTz-liposomeは、マウス血漿中においてインキュベーション後早期から内封薬物の顕著な漏出が見られた(34% (3時間))。そのため、化合物**1**導入リポソームを*in vivo*に適用するには、脂質組成を最適化する必要があり、臨床で利用されているDoxil[®]の脂質組成を参考として新たに化合物**1**導入リポソームを設計した(Table 2-1)。Doxil[®]の組成には、Tcが高いHSPCや脂質膜の安定性を改善しうるChol、血漿タンパク質の吸着によるオプソニン化を防ぐことで血中滞留性を高める1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (PEG-DSPE)が用いられている(HSPC/PEG-DSPE/Chol = 56.2/5.8/38.0 mol%) [4]。特に生体内での安定性を高めるためにCholとPEG-DSPEは必須であると考え、Cholを38 mol%、PEG-DSPEを5 mol%に固定し、HSPC+PEG-DSPE+化合物**1**(計62 mol%)に対する化合物**1**の割合を6~50 mol%の範囲とした。以降、HSPC/PEG-DSPE/Chol/化合物**1**で構成されるリポソームをHSTz-liposome、HSPC/PEG-DSPE/Cholで構成されるコントロールリポソームをHSPC-liposomeと記す。

作製した各HSTz-liposomeに含まれる化合物**1**を定量した。リポソームをエタノール/PBS (9/1 (v/v))溶液で可溶化した後、320 nmの吸光度を測定し、化合物**1**を定量した。HSPCについては、酵素法により定量を行った。その結果、脂質の薄膜形成時に化合物**1**を3.7~12.4 mol%混合したHSTz-liposomeでは、混和時の脂質組成に近いHSTz-

Table 2-1 Lipid composition and molar ratio in liposomal preparations.

	HSPC	PEG-DSPE	Chol	Compd. 1
HSPC-liposome	57.0	5.0	38.0	
HSTz(16:1)-liposome	53.3	5.0	38.0	3.7
HSTz(8:1)-liposome	50.1	5.0	38.0	6.9
HSTz(4:1)-liposome	44.6	5.0	38.0	12.4
HSTz(2:1)-liposome	36.3	5.0	38.0	20.7
HSTz(1:1)-liposome	26.0	5.0	38.0	31.0

Data are expressed as mol%.

The numbers in parentheses are the ratios between HSPC + PEG-DSPE and compd. **1**.

liposome がそれぞれ得られた。一方、20.7 mol%以上の化合物 **1** を混合したリポソームでは、化合物 **1** のリポソーム膜への導入割合は約 11 mol%にとどまったことから、リポソーム膜へ導入可能な化合物 **1** の割合には上限があると考えられた。いずれの HSTz-liposome も粒子径が 60~80 nm、ゼータ電位は-5~0 mV を示した。これらの値は、化合物 **1** を導入していない HSPC-liposome と大きく変わらず、化合物 **1** の導入がリポソームの形成に与える影響は大きくないと考えられた。Table 2-2 には、HSPC-liposome と HSTz(4:1)-liposome の粒子径、ゼータ電位の測定結果を示す。ここで、リポソーム膜に化合物 **1** が高い割合で導入されている場合、NB 誘導体とより効率良く反応し、顕著な膜特性変化が引き起こされると考えられたことから、今後の検討では主に化合物 **1** を 12.4 mol%含む HSTz(4:1)-liposome を用いて検討を行った。さらに、いずれのリポソームにおいても、モデル薬物として用いた $^{111}\text{In-DTPA}$ や DOX をそれぞれ配位子交換反応や pH 勾配を用いた方法により高効率に封入することができ、封入操作前後における物理化学的な性質に大きな変化は見られなかった (Table 2-2)。また、作製したリポソームをマウス血漿中でインキュベーションした結果、内封薬物はリポソームに高く保持され、高い安定性が示された (Fig. 2-2)。

Table 2-2 The physicochemical properties of liposomes and their encapsulation efficiency of ^{111}In -DTPA (A) or DOX (B), respectively.

(A)

Liposome	Size (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
HSPC-liposome	68.7 ± 4.1	-2.3 ± 0.5	
^{111}In -HSPC-liposome	72.9 ± 7.8	-3.0 ± 2.0	88.3 ± 6.9
HSTz(4:1)-liposome	71.4 ± 9.6	-2.0 ± 0.3	
^{111}In -HSTz(4:1)-liposome	68.6 ± 12.5	-2.4 ± 0.6	90.0 ± 6.1

(B)

Liposome	Size (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
HSPC-liposome	67.0 ± 13.3	-3.7 ± 2.4	
DOX-HSPC-liposome	62.8 ± 6.1	-3.9 ± 2.2	77.1 ± 8.1
HSTz(4:1)-liposome	84.5 ± 3.7	-1.5 ± 0.6	
DOX-HSTz(4:1)-liposome	86.6 ± 7.1	-3.4 ± 2.8	83.3 ± 13.2

Data are expressed as mean ± SD of at least three experiments.

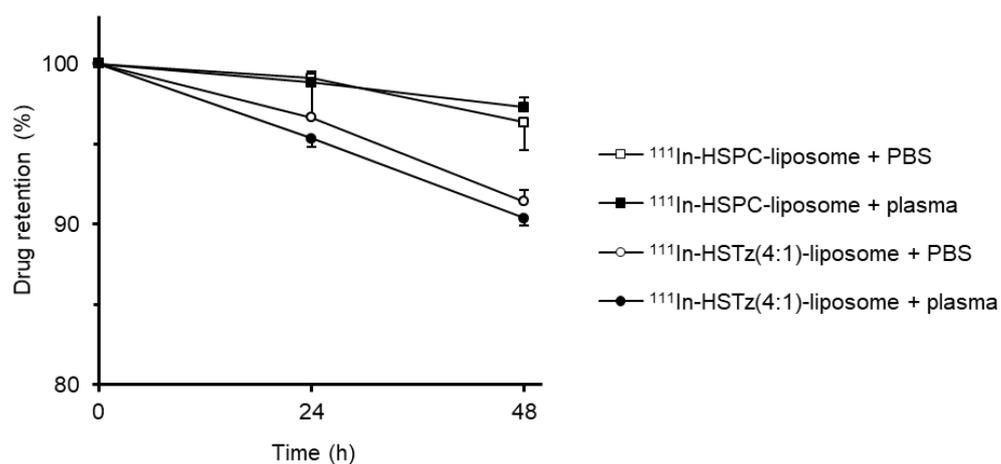


Fig. 2-2 The percentage of ^{111}In -DTPA retention in liposomes incubated in PBS and mouse plasma at 37°C. Results are expressed as mean ± SD (n = 3).

2-2-2 HSTz-liposome と NB 誘導体との化学反応の進行の検証

リポソームを構成する脂質組成の変更により、特にリポソーム表面に水和層を形成する PEG が生体直交型反応に影響することが考えられたため、リポソーム膜において化合物 **1** と NB 誘導体 (2-NB、NBCOOH) が化学反応を起こすかを第 1 章と同様の方法で質量分析により評価した。その結果、HSTz(4:1)-liposome (HSPC 終濃度 0.05 mM) と NB 誘導体 (終濃度 20 mM) とを混合した数分後には、化合物 **1** と NB 誘導体との化学反応による反応生成物の分子イオンピークがそれぞれ検出された (2-NB, m/z : calculated for $C_{53}H_{86}N_5O$ $[M+H]^+$ 808.6827, found 808.6816; NBCOOH, m/z : calculated for $C_{54}H_{86}N_5O_3$ $[M+H]^+$ 852.6725, found 852.6715)。また、化学反応後のさらなる酸化反応で生成した化合物の分子イオンピークもそれぞれ検出された (2-NB, m/z : calculated for $C_{53}H_{84}N_5O$ $[M+H]^+$ 806.6670, found 806.6662; NBCOOH, m/z : calculated for $C_{54}H_{84}N_5O_3$ $[M+H]^+$ 850.6569, found 850.6555)。

2-2-3 *In vitro* 薬物放出評価

リポソームを構成する脂質組成を変更することで内封薬物の放出性が変化することが報告されている[80]ことから、HSTz-liposome においても化合物 **1** と NB 誘導体との化学反応による薬物放出制御が可能であることを改めて検証した。第 1 章と同様に ^{111}In -DTPA をモデル薬物として内封した HSTz-liposome を用いて評価した。リポソーム (HSPC 終濃度 0.05 mM) と NBCOOH (終濃度 20 mM) あるいは PBS を混合し、37°C で一定時間インキュベーションした後、サイズ排除クロマトグラフィーにより分析した (Fig. 2-3)。

HSTz(4:1)-liposome と PBS を混合した 24 時間後の薬物放出率は 5%であった。一方、HSTz(4:1)-liposome と NBCOOH を混合した場合には、24 時間後には 80%以上の高い放出率を示したことから、化合物 **1** と NBCOOH との化学反応による薬物放出促進の関与が示唆された (Fig. 2-3A)。続いて、NBCOOH 濃度と薬物放出率の関係について検討した。5~20 mM の NBCOOH を用いて評価した結果、混合して 24 時間後の HSTz(4:1)-liposome からの薬物放出は、添加した NBCOOH の濃度依存的に増大した (Fig. 2-3B)。また、HSTz-liposome に含まれる化合物 **1** の割合を変化させた (16:1、8:1、4:1) 場合、NBCOOH と混合した 24 時間後にはいずれの HSTz-liposome も約 80%の放出率を示し、リポソーム膜における化合物 **1** の割合と薬物放出率との関係性は見られなかった (Fig. 2-3C)。

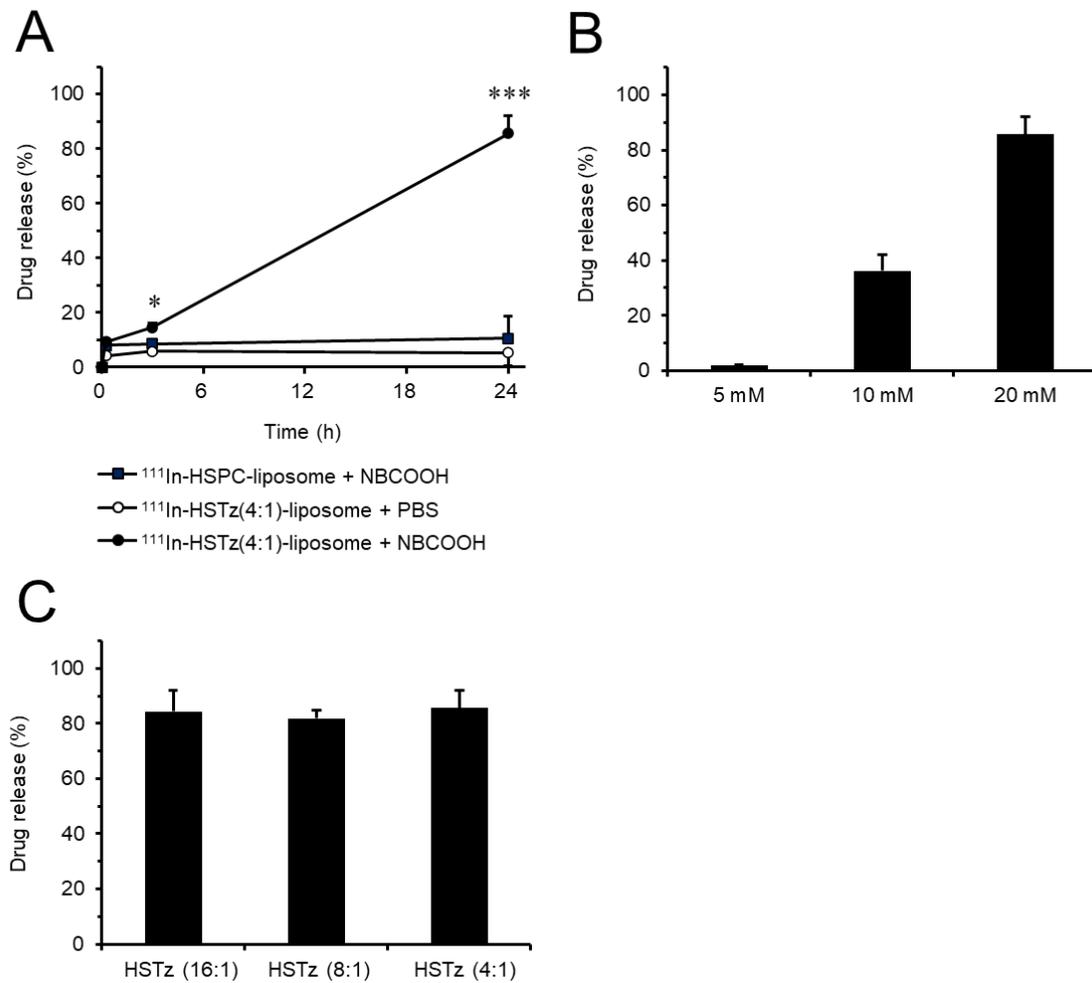


Fig. 2-3 *In vitro* drug release from HSTz-liposome and HSPC-liposome via reactions with NBCOOH. (A) Release rate of ^{111}In -DTPA (%) from liposomes reacted with NBCOOH (20 mM). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. HSPC-liposome + NBCOOH and HSTz(4:1)-liposome + PBS. (B) Release rate of ^{111}In -DTPA (%) from HSTz(4:1)-liposome reacted with various concentrations of NBCOOH (5, 10, and 20 mM) at 24 h. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). (C) Release rate of ^{111}In -DTPA (%) from HSTz-liposome (16:1, 8:1, and 4:1) reacted with NBCOOH (20 mM) at 24 h. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).

薬物放出に関しては、DDS キャリアの物理化学的性質が影響するだけでなく、内封している薬物自体の性質も関与することが知られている[86,87]。そこで、Doxil[®]と比較するために DOX を内封したリポソームを用いて薬物放出挙動について評価した。本評価も ¹¹¹In-DTPA を用いた評価と同様に、リポソーム (HSPC 終濃度 0.05 mM) と NB 誘導体 (終濃度 20 mM) あるいは PBS を混合し、37°C で一定時間インキュベーション後、サイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。しかし、DOX 自体がカラムに吸着され定量が困難であったため、リポソームに内封された DOX の保持率を算出することで、薬物放出促進効果について評価した。薬物保持率については、リポソームに内封された DOX 由来の蛍光強度を測定し、サイズ排除カラムに添加した DOX 内封リポソーム溶液の蛍光強度に対する割合として算出した。その結果、HSTz(4:1)-liposome では、NBCOOH と混合すると、PBS と混合した場合や HSPC-liposome に NBCOOH を混合した場合と比較して、薬物保持率が有意に低下した (Fig. 2-4A)。また、この薬物保持率は経時的に低下した。なお、NBCOOH の濃度に依存して保持率は低下する傾向が見られた (Fig. 2-4B)。さらに、添加する NB 誘導体 (2-NB、NBCOOH) を比較すると、2-NB を添加した時に大きな変化が認められなかった一方で、NBCOOH を添加した時の保持率は大きく低下した (Fig. 2-4C)。以上の結果から、DOX を内封した HSTz(4:1)-liposome においても ¹¹¹In-DTPA を内封した HSTz(4:1)-liposome と同様に、化合物 **1** と NBCOOH との化学反応を介した薬物放出促進が可能であると考えられた。

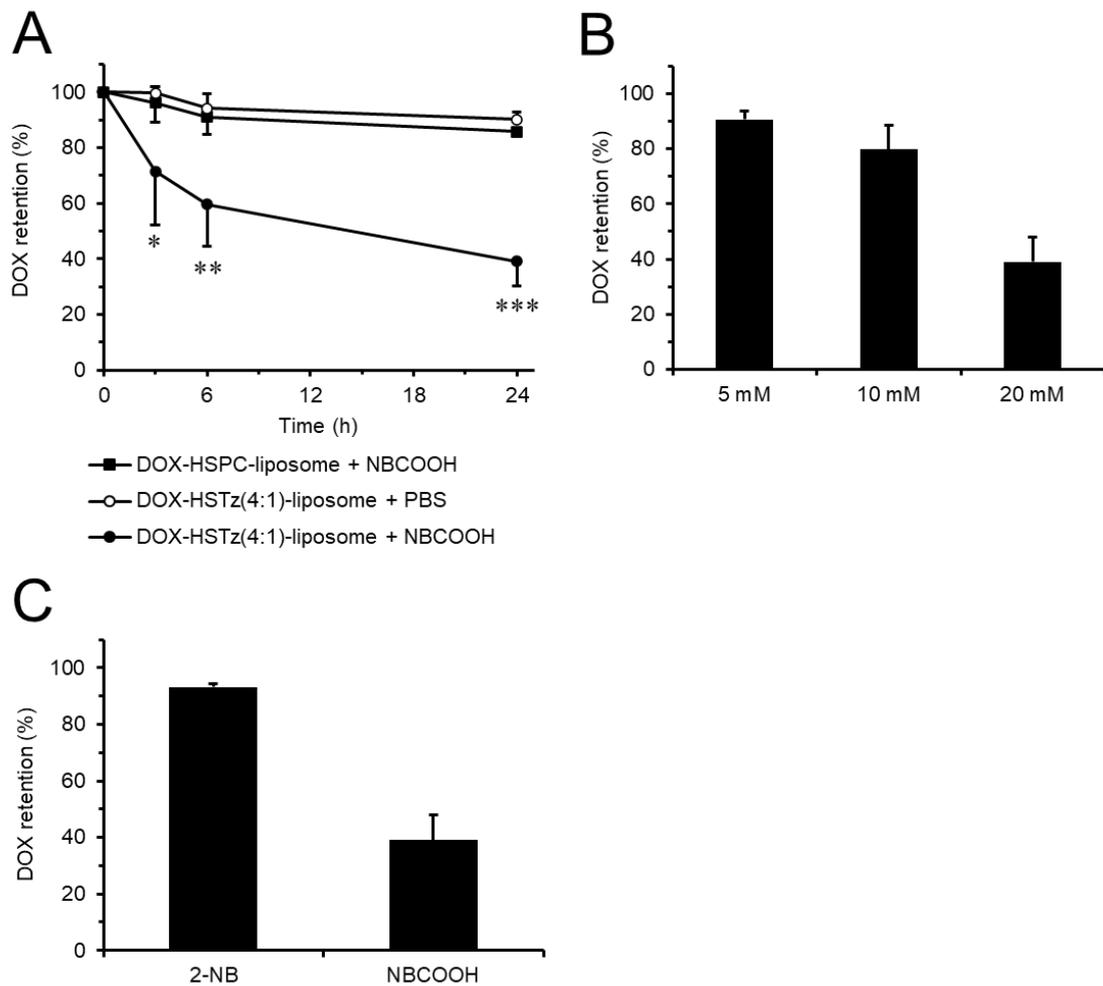


Fig. 2-4 *In vitro* drug release from HSTz(4:1)-liposome and HSPC-liposome via reactions with NBCOOH. (A) Retention rate of DOX (%) in liposomes reacted with NBCOOH (20 mM). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. HSPC-liposome + NBCOOH and HSTz(4:1)-liposome + PBS. (B) Retention rate of DOX (%) in HSTz-liposome at 24 h after incubation with various concentrations of NBCOOH (5, 10, and 20 mM). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). (C) Retention rate of DOX (%) in HSTz(4:1)-liposome at 24 h after incubation with 2-NB (20 mM) or NBCOOH (20 mM). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).

2-2-4 HSTz-liposome と NBCOOH の細胞毒性評価

HSTz-liposome および NBCOOH を *in vivo* へ展開するにあたり、がん細胞 (colon26) とマクロファージ様細胞 (RAW264) を用いた細胞毒性を評価した。これらの細胞をリポソーム (HSPC 濃度 0.5~50 mM) あるいは NBCOOH (0.008~8 mM) に 24 時間暴露させ、WST-8 assay により細胞生存率を算出した。その結果、DOX を内封していない条件で HSTz(4:1)-liposome は、HSPC-liposome と比較していずれの細胞においても顕著な生存率の低下を示さなかったことから、HSTz(4:1)-liposome 自体に細胞傷害性はないことが示唆された (Fig. 2-5A and 2-5B)。また NBCOOH を添加した場合、添加濃度の増加に伴って細胞生存率は低下する傾向にあったが、その程度は顕著でなかったことから、NBCOOH についても細胞の生存率に大きく影響しないことが示唆された (Fig. 2-5C)。

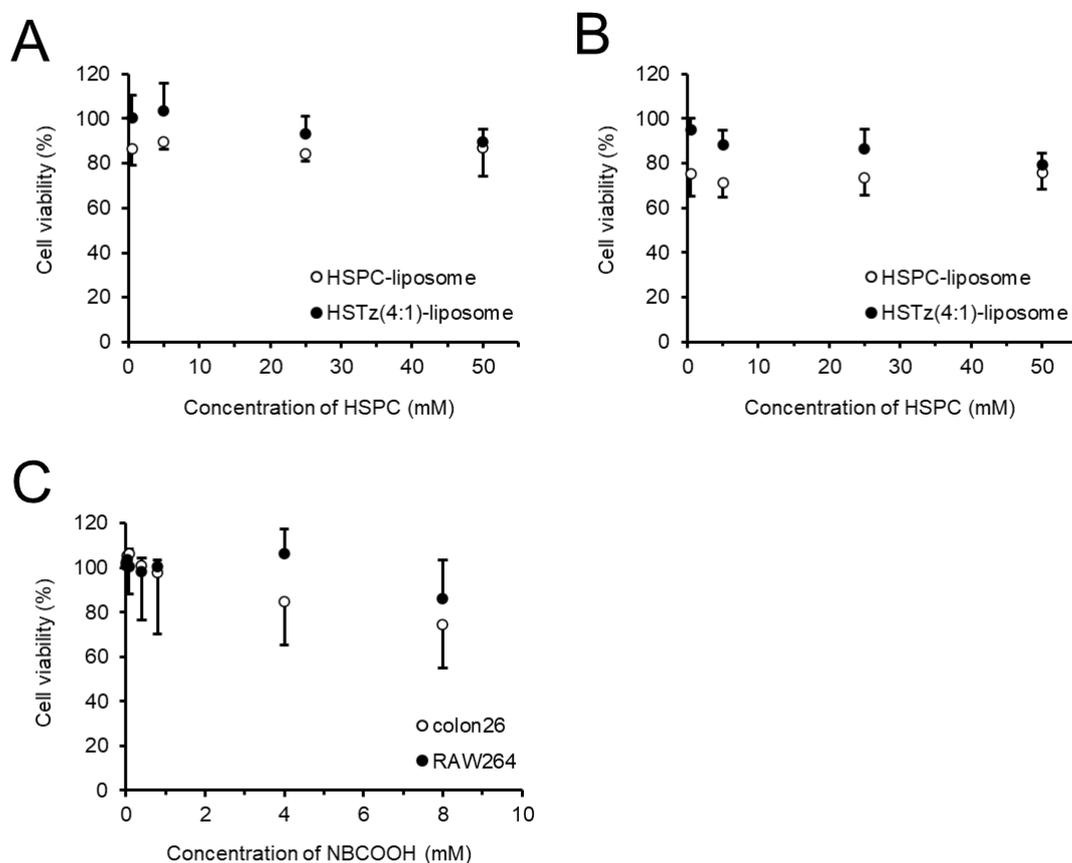


Fig. 2-5 *In vitro* cytotoxicity of DOX-free liposomes and NBCOOH to tumor cell (colon26) and macrophage (RAW264). Cell viability of colon26 (A) and RAW264 (B) treated with empty liposomes, and colon26 and RAW264 treated with NBCOOH (C). Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).

2-2-5 リポソームの体内動態評価

本薬物放出促進法を用いたがん治療において、リポソームを投与した後に NB 誘導体を投与するタイミングが非常に重要となる。それを決定するために、リポソームの体内動態を評価した。¹¹¹In-DTPA を内封した HSPC-liposome と HSTz(4:1)-liposome を colon26 皮下移植担がんモデルマウスに静脈内投与し、生体内放射能分布を評価した結果を Table 2-3 および 2-4 に示す。HSPC-liposome と HSTz(4:1)-liposome のいずれにおいても、RES である脾臓と肝臓へ高く集積した。また、いずれのリポソームも、投与 6~48 時間後にがんへ比較的高く集積した一方で、血液からは投与 48 時間後にほとんどが消失した。その他の臓器への分布も含めて、HSPC-liposome と HSTz(4:1)-liposome の体内挙動に大きな違いは見られなかった。なお、排泄に関して、いずれのリポソームも主に尿中に高い放射能が検出されたが、HSTz(4:1)-liposome の方が排泄される割合が低い傾向が見られた。以上の結果から、血液中での HSTz-liposome と NB 誘導体との化学反応を避けるために、NB 誘導体の投与はリポソームを投与した 48 時間後とした。

Table 2-3 Biodistribution of HSPC-liposomes encapsulating ¹¹¹In-DTPA in tumor-bearing mice.

	Time after administration			
	6 h	24 h	48 h	72 h
Blood	14.31 ± 1.90	3.48 ± 0.18	0.60 ± 0.10	0.09 ± 0.03
Spleen	145.55 ± 11.96	123.51 ± 15.75	126.56 ± 16.93	92.76 ± 21.92
Pancreas	0.65 ± 0.15	0.30 ± 0.06	0.30 ± 0.08	0.23 ± 0.06
Stomach	0.48 ± 0.14	0.46 ± 0.23	0.37 ± 0.10	0.32 ± 0.13
Intestines	0.84 ± 0.24	0.83 ± 0.05	0.87 ± 0.09	0.64 ± 0.11
Kidney	3.25 ± 0.49	3.65 ± 0.40	2.73 ± 0.15	1.85 ± 0.26
Liver	36.93 ± 3.67	36.31 ± 3.38	35.48 ± 4.30	21.96 ± 4.16
Heart	1.63 ± 0.20	1.00 ± 0.18	1.16 ± 0.34	0.74 ± 0.20
Lung	3.60 ± 0.31	1.64 ± 0.12	0.85 ± 0.03	0.52 ± 0.05
Muscle	0.36 ± 0.07	0.28 ± 0.08	0.22 ± 0.04	0.18 ± 0.04
Tumor	4.99 ± 0.43	5.30 ± 1.12	4.11 ± 0.88	1.62 ± 0.19
Urine ^a		15.07 ± 0.46	23.03 ± 1.05	28.87 ± 1.80
Feces ^a		1.62 ± 0.42	3.52 ± 0.55	4.71 ± 0.60
T / B ratio ^b	0.35 ± 0.06	1.52 ± 0.28	5.75 ± 1.51	18.47 ± 5.11

Results are expressed as means (%ID/g) ± SD values.

^ameans (%ID) ± SD values

^bT / B ratio, tumor-to-blood ratio

Table 2-4 Biodistribution of HSTz(4:1)-liposomes encapsulating ¹¹¹In-DTPA in tumor-bearing mice.

	Time after administration			
	6 h	24 h	48 h	72 h
Blood	13.61 ± 0.82	2.38 ± 0.47	0.71 ± 0.13	0.07 ± 0.01
Spleen	153.18 ± 10.60	141.27 ± 19.57	148.68 ± 16.69	97.75 ± 5.20
Pancreas	0.62 ± 0.14	0.32 ± 0.10	0.40 ± 0.08	0.33 ± 0.15
Stomach	0.28 ± 0.05	0.38 ± 0.13	0.50 ± 0.12	0.25 ± 0.09
Intestines	0.70 ± 0.03	0.70 ± 0.10	0.89 ± 0.14	0.53 ± 0.05
Kidney	3.07 ± 0.16	2.79 ± 0.31	2.76 ± 0.19	1.89 ± 0.36
Liver	41.47 ± 0.63	35.85 ± 6.02	42.41 ± 4.68	27.51 ± 1.06
Heart	1.32 ± 0.09	1.01 ± 0.33	0.93 ± 0.18	0.68 ± 0.09
Lung	3.12 ± 0.23	1.38 ± 0.31	1.02 ± 0.11	0.50 ± 0.07
Muscle	0.29 ± 0.08	0.18 ± 0.07	0.31 ± 0.05	0.17 ± 0.02
Tumor	4.25 ± 0.62	4.74 ± 1.01	3.59 ± 0.91	1.47 ± 0.32
Urine ^a		10.48 ± 2.03	17.86 ± 1.54	24.62 ± 1.62
Feces ^a		0.84 ± 0.39	1.91 ± 0.34	2.77 ± 0.34
T / B ratio ^b	0.31 ± 0.03	2.04 ± 0.45	5.13 ± 1.22	21.16 ± 6.33

Results are expressed as means (%ID/g) ± SD values.

^ameans (%ID) ± SD values

^bT / B ratio, tumor-to-blood ratio

2-2-6 *In vivo* 薬物放出評価

続いて、本薬物放出促進法が *in vivo* において機能するか検証することを計画した。PEG 修飾リポソームは、細胞膜との相互作用が低減されるために、細胞取り込み率が劇的に低下することが知られている[88]。そのため、静脈内投与されたリポソームががん組織へ集積しても細胞内へ取り込まれず、がん組織内の血管近傍や間質に局在する可能性が高い[88,89]。がん組織の間質に局在する ¹¹¹In-DTPA 内封リポソームから ¹¹¹In-DTPA が放出された場合、水溶性の高い ¹¹¹In-DTPA は細胞内に取り込まれることなく、がん組織から速やかに排泄されるのではないかと考え、リポソーム投与後に NB 誘導体を投与し、それ以降のがん組織における放射能の減少を指標に *in vivo* における薬物放出促進効果について評価した。実際に ¹¹¹In-DTPA を腫瘍内に直接投与すると速やかにがん組織

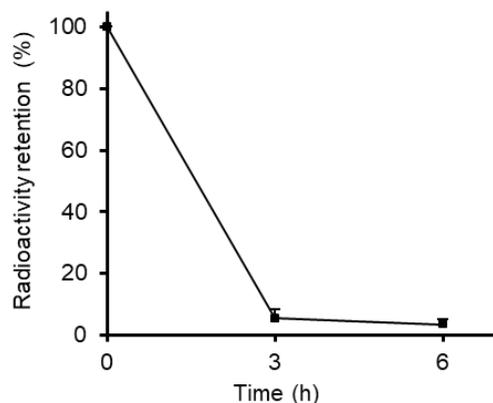


Fig. 2-6 Evaluation of intratumoral retention of ^{111}In -DTPA in tumor-bearing mice. Radioactivity retention (%) in the tumor after intratumoral injection of ^{111}In -DTPA. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3).

から排泄された (Fig. 2-6)。

^{111}In -DTPA 内封リポソームを投与した 48 時間後に各溶液 (5%エタノール/PBS 溶液 (vehicle)、NBCOOH、2-norbornanecarboxylic acid (NBaneCOOH)) を投与し、その 6 時間後のがんにおける放射能集積を評価した。なお、NBaneCOOH は、NBCOOH の二重結合を還元し、Tz との反応性を無くした化合物であり、ネガティブコントロールとして用いた。その結果、HSPC-liposome を投与した後に vehicle あるいは NBCOOH を投与した場合、がんへの集積はそれぞれ 3.6%ID/g と 3.3%ID/g であり、大きな差は見られなかった (Table 2-5A)。一方、HSTz(4:1)-liposome においては、vehicle または NBCOOH を投与した場合のがんにおける集積は、それぞれ 3.4%ID/g と 2.4%ID/g であり、NBCOOH 投与群において有意に低い値を示した (Table 2-5B)。さらに NBaneCOOH 投与群では、がんへの集積が 3.2%ID/g となり、vehicle 投与群と大きく変わらなかった。なお、他の臓器や組織における放射能分布は、いずれの溶液を投与した場合においても大きな変化は見られなかった (Table 2-5)。以上の結果から、がん組織において、化合物 **1** と NBCOOH との生体直交型反応による ^{111}In -DTPA 内封リポソームからの薬物放出促進が示唆された。

Table 2-5 Biodistribution of HSPC-liposome (A) and HSTz(4:1)-liposome (B) encapsulating ¹¹¹In-DTPA 6 h after injection of vehicle, NBCOOH, or NBaneCOOH to tumor-bearing mice. NB derivatives were injected 48 h post-injection of liposomes.

(A)

	+ vehicle	+ NBCOOH
Blood	0.33 ± 0.10	0.34 ± 0.10
Spleen	109.40 ± 20.79	105.20 ± 25.21
Pancreas	0.21 ± 0.03	0.29 ± 0.05
Stomach	0.34 ± 0.02	0.57 ± 0.41
Intestines	0.79 ± 0.10	0.78 ± 0.16
Kidney	2.89 ± 0.14	2.14 ± 0.25
Liver	31.54 ± 2.54	32.51 ± 2.43
Heart	0.88 ± 0.16	0.61 ± 0.27
Lung	0.83 ± 0.08	0.70 ± 0.21
Muscle	0.30 ± 0.11	0.32 ± 0.35
Tumor	3.60 ± 0.66	3.25 ± 0.35

(B)

	+ vehicle	+ NBCOOH	+ NBaneCOOH
Blood	0.27 ± 0.06	0.23 ± 0.05	0.35 ± 0.19
Spleen	114.81 ± 14.11	114.78 ± 15.67	120.51 ± 32.35
Pancreas	0.35 ± 0.13	0.35 ± 0.14	0.25 ± 0.06
Stomach	0.42 ± 0.23	0.52 ± 0.15	0.42 ± 0.09
Intestines	0.65 ± 0.12	0.70 ± 0.15	0.75 ± 0.08
Kidney	2.39 ± 0.25	2.85 ± 0.60	2.45 ± 0.44
Liver	35.49 ± 1.50	39.88 ± 2.18	41.63 ± 8.42
Heart	0.84 ± 0.27	0.70 ± 0.16	0.81 ± 0.27
Lung	0.84 ± 0.23	0.85 ± 0.14	0.83 ± 0.06
Muscle	0.19 ± 0.09	0.20 ± 0.04	0.18 ± 0.09
Tumor	3.36 ± 0.39	2.36 ± 0.31 ^{****}	3.20 ± 0.41

Results are expressed as means (%ID/g) ± SD values.

^{**} $p < 0.01$ vs. HSTz(4:1)-liposome + vehicle, ^{****} $p < 0.001$ vs. HSTz(4:1)-liposome + NBaneCOOH.

リポソームに内封された DOX は細胞に取り込まれにくい一方で、リポソームから放出された DOX は脂溶性が高く細胞内へ取り込まれる。したがって、がん組織内において DOX 由来の蛍光とリポソーム膜を標識した蛍光脂質 (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate, DiO-C₁₈) 由来の蛍光が、どのように分布するかを蛍光顕微鏡により観察することで、薬物放出促進効果について評価できると考えた。上述の ¹¹¹In-DTPA 内封リポソームを用いた評価と同様に、DOX を内封した DiO-C₁₈ 標識リポソームを投与した 48 時間後に各溶液 (vehicle、NBCOOH) を投与し、その 6 時間後にがんの組織切片を作製して評価した (Fig. 2-7)。その結果、HSPC-liposome については、vehicle あるいは NBCOOH を投与したいずれの群においても、DOX と DiO-C₁₈ の共局在が観察された。一方、HSTz(4:1)-liposome については、vehicle 投与群では DOX と DiO-C₁₈ の共局在が観察されたのに対し、NBCOOH 投与群では、DOX が DiO-C₁₈ の周辺に広く分布している様子が観察された。したがって、がん組織において、化合物 **1** と NBCOOH との生体直交型反応による HSTz(4:1)-liposome からの DOX の放出促進が示唆された。

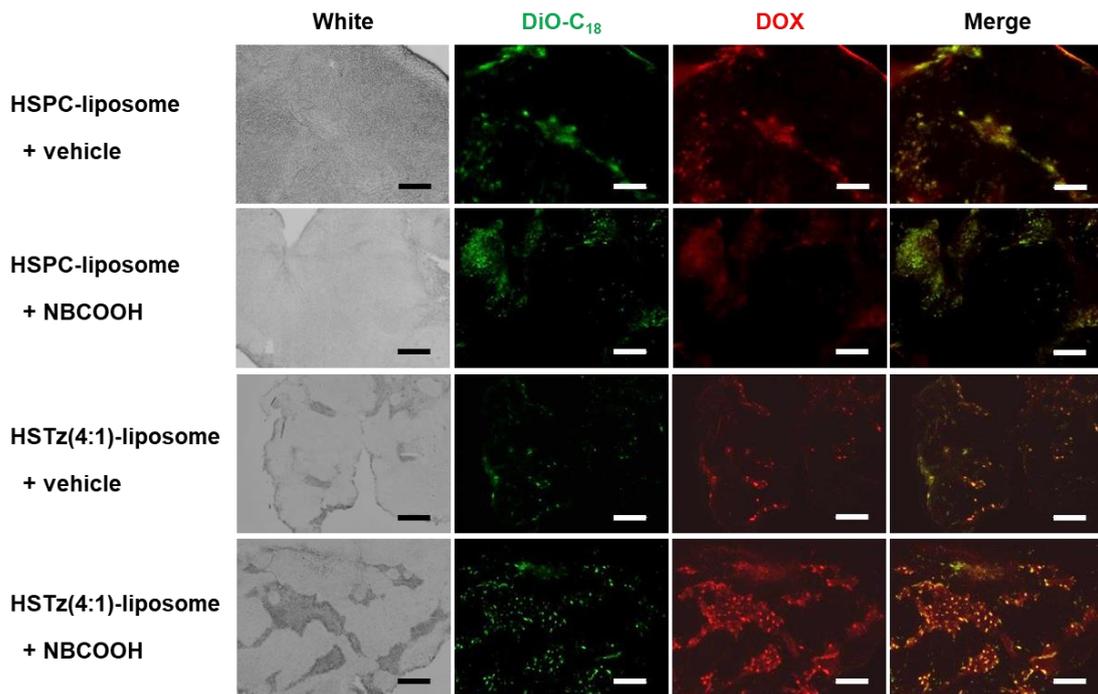


Fig. 2-7 *In vivo* evaluation of drug release from liposome following the bioorthogonal IEDDA reactions with NBCOOH in the tumors. DOX-encapsulating liposomes were intravenously injected into mice, and at 48 h post-injection of the liposomes, NBCOOH or vehicle were intravenously administered. Six hours later, the tumors were excised, followed by fluorescence microscopy study. Intratumoral localization of DOX (red) and DiO-C₁₈ (green). Scale bar: 500 μ m.

2-2-7 治療評価

前節までの実験結果より、がん組織において生体直交型反応に基づく HSTz-liposome からの薬物放出促進が示唆されたことより、DOX 内封リポソームを用いた治療実験を実施した。

治療は、まず DOX 内封リポソームを投与し、さらにその 48 時間後に NB 誘導体を投与するという 2 段階の投与スケジュールで行った。Colon26 細胞を皮下移植して 5 日目の担がんマウスを 9 つの治療群 ((a) PBS + vehicle、(b) PBS + NBCOOH、(c) DOX-HSPC-liposome (5 mg/kg) + vehicle、(d) DOX-HSPC-liposome (5 mg/kg) + NBCOOH、(e) DOX-HSTz(4:1)-liposome (5 mg/kg) + vehicle、(f) DOX-HSTz(4:1)-liposome (5 mg/kg) + NBCOOH、(g) DOX-HSTz(4:1)-liposome (5 mg/kg) + NBaneCOOH、(h) DOX-HSTz(4:1)-liposome (2.5 mg/kg) + vehicle、(i) DOX-HSTz(4:1)-liposome (2.5 mg/kg) + NBCOOH) に分けて治療実験を開始し、経時的にがんの体積を測定した。Fig. 2-8 に治療開始後のがん体積の経時変化を示す。リポソーム投与後 6 日目において、DOX-HSPC-liposome や DOX-HSTz(4:1)-liposome を投与した治療群 ((c), (e), (h)) では、DOX 未投与群 ((a), (b)) に対して腫瘍体積が低値を示す傾向が見られた。また、DOX-HSTz(4:1)-liposome と NBCOOH を組み合わせた治療群 ((f)) では、DOX-HSTz(4:1)-liposome と vehicle を組み合わせた治療群 ((e)) に対して、腫瘍の成長を顕著に抑制した。さらに、リポソーム投与後 6 日目以降において、DOX-HSTz(4:1)-liposome と NBCOOH を組み合わせた治療群 ((f), (i)) では、Doxil[®]と同等の脂質組成から作製された DOX-HSPC-liposome と vehicle を組み合わせた治療群 ((c)) に対して、腫瘍の成長を顕著に抑制した。リポソーム投与後 8 日目においては、治療群(f)では、DOX-HSTz(4:1)-liposome と vehicle や NBaneCOOH を組み合わせた治療群 ((e), (g)) に対して、有意に高い腫瘍の成長抑制効果を示した。一方、いずれの治療群においても顕著な体重減少は見られなかった (Fig. 2-8B)。以上のことから、HSTz(4:1)-liposome と NBCOOH による生体直交型反応を利用した薬物放出促進法が、より効果的ながん治療戦略となる可能性が示された。

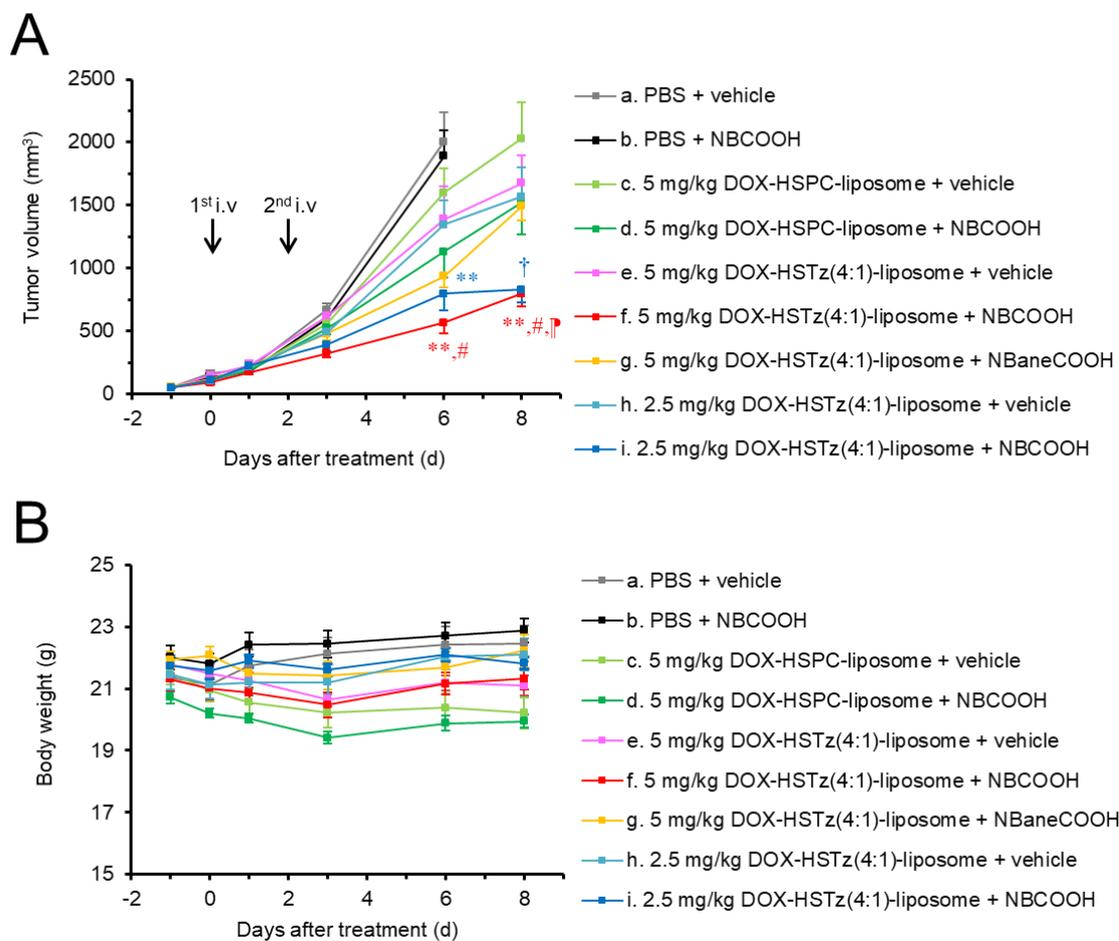


Fig. 2-8 Anti-tumor effect of DOX-HSTz(4:1)-liposome *via* the bioorthogonal IEDDA reactions with NBCCOOH in colon26 tumor-bearing mice. DOX-liposomes were intravenously injected into tumor-bearing mice (1st i.v.), and at 48 h post-injection of the liposomes, NBCCOOH, vehicle, or NBaneCCOOH (negative control) were intravenously administered (2nd i.v.). (A) Tumor growth suppression by a combination therapy of DOX-HSTz(4:1)-liposome and NBCCOOH. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 8 mice in each group). One-way ANOVA followed by Tukey's test was used for multiple comparisons among groups (c-i). ** p < 0.01, [†] p < 0.05 vs. group (c), # p < 0.05 vs. group (e), [‡] p < 0.01 vs. group (g). (B) Body weight change of tumor-bearing mice treated with each preparation. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 8).

2-3 考察

はじめに、臨床への適用を目指して Doxil[®]を参考に化合物 **1** 導入リポソームの脂質組成について検討した。作製した HSTz-liposome の粒子径やゼータ電位は Doxil[®]と大きく変わらず、また、それらはモデル薬物を内封する前後においても大きく変わらなかったことから、化合物 **1** をリポソームに導入することやモデル薬物の封入工程が、リポソームの物理化学的な性質に及ぼす影響は小さいと考えられた。加えて、HSTz(4:1)-liposome はマウス血漿中においても安定に薬物を保持したまま存在していた (Fig. 2-2)。したがって、HSTz(4:1)-liposome が Doxil[®]と同様に静脈内投与された後も、血液中を循環している間に内封薬物を大きく漏出することなく、がん組織に送達されるものと推察された。

In vitro 薬物放出評価では、第 1 章と同様に NBCOOH との化学反応による HSTz-liposome からの薬物放出促進を認めた。一方、化学反応後早期における HSTz(4:1)-liposome からの ¹¹¹In-DTPA の放出率は、POTz-liposome を用いた場合と比べて低い値を示した。これは、POPC と比べて HSPC の Tc が高いことから、HSTz-liposome が POTz-liposome よりも硬いリポソーム膜を形成していることに起因した可能性が高い[80]。また、モデル薬物に ¹¹¹In-DTPA と DOX を用いた場合で放出挙動に違いが見られた。これは、モデル薬物自体の特性が関与し、¹¹¹In-DTPA よりも脂溶性の高い DOX がリポソーム膜により強く保持されたためであると考えられた。すなわち、既に報告されているように [86,87]、リポソームに内封する薬物の特性に依存して放出挙動は変化するため、薬物ごとに放出性評価が必要であると考えられる。今回の検討において、HSPC と化合物 **1** の組成 (16 : 1、8 : 1、4 : 1) に依らず HSTz-liposome からの ¹¹¹In-DTPA の放出率は同程度の高い値を示した。NBCOOH との反応効率を考慮して、化合物 **1** 導入率の最も高い HSTz(4:1)-liposome を用いた *in vivo* 実験を進めたが、今後、さらに脂質組成の検討を重ねることで、より効果的な薬物放出挙動等を示すリポソームが作製できる可能性がある。

担がんモデルマウスにおけるリポソームの体内動態は、リポソーム膜への化合物 **1** の導入前後で大きく変化することはなかった。リポソームの体内動態の結果から、血液中での化学反応を避けるために、リポソームのほとんどが血液中から消失した時間 (リポソーム投与 48 時間後) を NBCOOH の投与タイミングとした。実際、これに従って NBCOOH を投与しがんの抽出物について質量分析した結果、化合物 **1** と NBCOOH の化学反応による生成物の分子イオンピークが認められたことから、がん部位における生体直交型反応の進行が確認された。一方、NBCOOH の体内動態は不明であり、投与量

が最適であるかの検討まではできていない。そのため今後、NB 誘導体の放射性標識体を合成し、体内動態の解明や生体直交型反応の進行の程度を解析する必要がある。

担がんマウスに投与されたリポソームは、がん組織において、不均一な分布を示した (Fig. 2-7)。リポソームは EPR 効果によりがんへ集積し、血管近傍に局在したと推察された。また、リポソーム表面の PEG により形成される水和層により細胞との相互作用が抑制され[88]、がん組織の血管から漏出した後のがん組織の間質に局在した可能性が高い。しかしながら、NBCOOH を投与すると、DOX ががん組織に広く拡散している様子が観察されたため、本研究で開発した生体直交型反応を利用した薬物放出制御法が *in vivo* においても機能することが示唆され、高いがん治療効果が期待された。

DOX 内封 HSTz(4:1)-liposome と NBCOOH との生体直交型反応の組み合わせを用いたがんの治療効果を検討した結果、がんの成長を有意に抑制した (Fig. 2-8A)。一方、HSTz(4:1)-liposome 投与後に vehicle や NBaneCOOH を投与した場合には、顕著な抗がん効果が示されなかったことから、化合物 **1** と NBCOOH との生体直交型反応を介した内封薬物の放出促進が治療効果の発現に重要な因子となると考えられた。さらに、DOX を半量にした HSTz(4:1)-liposome と NBCOOH の組み合わせで治療を行った場合でも、HSPC-liposome と比較して、がんの成長を有意に抑制したことより、本治療戦略は副作用の低減にも繋がるものと期待された。なお、DOX を内封していない HSTz(4:1)-liposome と NBCOOH 自体は顕著な細胞傷害性を示さなかったことから (Fig. 2-5)、今回の治療効果はリポソームから放出された DOX に依存した結果であると考えられた。

以上より、固形がんに対する効果的な薬物治療を実現する新たな薬物放出制御型リポソーム製剤の開発に成功した。本手法は、これまでに報告されている熱応答性リポソームや光応答性リポソームと同等のがん治療効果を示すと考えられた[27,28,32]。今後、様々ながん種を用いた検討や治療スケジュールの最適化を行うことで、より効果的ながん治療戦略となる可能性が考えられる。

2-4 小括

- Doxil[®]を参考に作製した化合物 **1** 導入リポソーム (HSTz-liposome) は、マウス血漿中において安定に存在した。さらに、*in vitro* において、NBCOOH との化学反応により内封薬物の放出を顕著に促進させることが明らかとなった。
- *In vivo* において、HSTz-liposome と NBCOOH を組み合わせて投与することで、がん組織内でリポソームからの内封薬物の放出が促進される可能性が示された。
- HSTz-liposome と NBCOOH を組み合わせたがんの薬物治療では、がんの成長を有意に抑制することが明らかとなり、生体直交型反応を利用した新たながんの治療法となる可能性が示された。

総括

本研究では、生体直交型反応を利用した薬物放出制御型リポソーム製剤の開発を目的に、1. 両親媒性 Tz 誘導体の合成とリポソームへの応用、2. 生体直交型反応を介した薬物放出制御型リポソーム製剤によるがん治療効果の増強、について検討し、以下の知見を得た。

1. 両親媒性 Tz 誘導体の合成とリポソームへの応用

Tz と NB 誘導体との生体直交型反応によるリポソームからの薬物放出促進を達成するために、新規両親媒性 Tz 誘導体 **1** の合成に成功し、それを導入したリポソームの作製に成功した (POTz-liposome)。また、この POTz-liposome は、NB 誘導体との化学反応により、内封薬物の放出促進が可能であった。さらに、Langmuir 単分子膜を用いた評価により、リポソームの膜特性が本化学反応前後で変化することを明らかとし、この膜特性変化が薬物放出促進の要因となる可能性を示した。

2. 生体直交型反応を介した薬物放出制御型リポソーム製剤によるがん治療効果の増強

リポソームの脂質組成を最適化し、化合物 **1** を導入したリポソームの生理的条件下における安定性の向上を達成した (HSTz-liposome)。HSTz-liposome においても、NB 誘導体との化学反応により、内封薬物の放出促進が可能であった。また、DOX を内封した HSTz-liposome と NB 誘導体を組み合わせて処置した場合、DOX ががん組織内に広く拡散している様子が認められたことから、本薬物放出制御法が *in vivo* においても機能することが示された。さらに、本薬物放出制御法により、がんの成長を有意に抑制したことから、有効ながん治療戦略となる可能性が示された。

以上の結果から、生体直交型反応を利用した薬物放出制御型リポソーム製剤の開発に成功した。本手法では、周辺環境に依存しない生体内での化学反応が薬物放出促進の契機となるため、がん種や部位に左右されず様々ながんに適用可能であると想定される。

以上、本研究で得られた知見が、高い治療効果と安全性の両立を目指したがんの化学療法の実用化や新たな医薬品開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました本学薬品物理化学講座教授・向高弘先生に深く感謝の意を表します。

本研究論文の審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました本学製剤学講座教授・坂根稔康先生、薬剤学講座教授・大河原賢一先生、機能性分子化学研究室教授・田中将史先生に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、研究内容への適切な御助言・御教示を賜りました本学薬品物理化学講座准教授・佐野紘平先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有機化学や分子イメージング手法をはじめとした多くの技術を御教示して頂くと共に、日頃から活発な議論をして頂きました、本学薬品物理化学講座助教・山崎俊栄先生、金沢大学臨床分析学講座助教・宗兼将之先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有益なる御助言と深い御理解を頂きました本学放射線管理室准教授・安岡由美先生に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて頂き、有益な御助言と御指導を賜りました武庫川女子大学分析化学研究室教授・萩森政頼先生に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大な御協力を賜りました第一薬科大学臨床薬学講座薬剤設計学分野准教授・中原広道先生に厚く御礼申し上げます。

有益な御助言を頂きました薬品物理化学講座の諸先輩、後輩の皆様に感謝致します。

令和2年度からの2年間にわたり公益社団法人 日本薬学会長井記念薬学研究奨励事業による御援助を賜りましたので、ここに深謝の意を表します。

最後に、これまでの研究生生活を終始温かく見守り、励まし続けてくれた家族に心から感謝致します。

実験の部

研究全般に関する項目

本研究に用いた主要な試薬、機器などについて以下に一括する。動物実験は、神戸薬科大学動物実験委員会の承認を得たのち、神戸薬科大学動物実験実施規定を遵守し、動物に不必要な苦痛を与えぬよう十分に配慮して行った。

試薬・機器

2-Cyanopyridine および 5-amino-2-cyanopyridine は、Merck 社から購入した。Hydrazine hydrate、2-hexadecyloctadecanoic acid、thionyl chloride、ICG、NB(COOH)₂、DTPA は、東京化成工業から購入した。Boric acid、dry tetrahydrofuran (THF)、triethylamine (TEA)、その他合成に用いた有機溶媒、2-NB、NBCOOH、LabAssay Phospholipid は、富士フィルム和光純薬から購入した。POPC、DSPC、PEG-DSPE は Avanti Polar Lipid 社から購入した。HSPC は、日油から購入した。DOX は、LC Laboratories 社から購入した。8-Quinololinol、Chol、DiO-C₁₈ は、Sigma Aldrich 社から購入した。EDTA および CCK-8 は同仁化学研究所から購入した。PBS(-)、DMEM、およびベロナール緩衝液 (pH 8.6、I = 0.06) は、ナカライテスクから購入した。¹¹¹InCl₃ (74 MBq/mL) の 0.01 N HCl 溶液は、日本メジフィジックスより提供を受けた。

中圧分取液体クロマトグラフィーには、山善製の自動設定中圧分取液体クロマトグラフシステム (YFLC AI-580) を使用し、Purif-Pack-EX (充填材：シリカゲル SiOH、粒子径：50 μm、カラムサイズ：M-L) を装着した。核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance, NMR) 測定には、Agilent Technologies 社製の Varian Mercury 300 を用い、重水素化溶媒中の残留溶媒を内標準物質として測定した。エレクトロスプレーイオン化高分解能質量分析 (electrospray ionization high-resolution mass spectrometry, ESI-HRMS) には、Thermo Fisher Scientific 社製の Thermo Scientific Exactive を使用した。放射能の測定には、PerkinElmer 社製の Wizard 1480 および Aloka 社製の CURIE METER IGC-3 を用いた。吸光スペクトルの測定には、島津製作所製の UV-2450 UV-Visible Spectrophotometer を使用した。蛍光スペクトルの測定には、日立ハイテクサイエンス製の Hitachi F-7000 Fluorescence Spectrophotometer を使用した。プレートリーダーには、日立ハイテクサイエンス製の MICROPLATE READER SH-9000 Lab を使用した。リポソームのサイズ調整には、

Avanti Polar Lipid 社製の Mini-Extruder set、および TOMY 精工製の UD-201 を使用した。リポソーム精製時のサイズ排除クロマトグラフィーには、GE Healthcare 社製の Sephadex G-25 (PD-10) および Sephadex G-50 をゲルとして用いたカラムを使用した。セルロースアセテート電気泳動には、ADVANTEC 製の SELECA-V を使用した。リポソームの粒子径とゼータ電位は、Malvern 社製の Zetasizer Nano ZS により測定した。Langmuir 単分子膜測定では、KSV Instruments 社製の KSV Minitrough を使用した。表面圧の測定には、ろ紙 (周囲長=20 mm、Whatman 541) を使用した。表面電位の測定には、KSV Instruments 社製の KSV SPOT 1 を使用し、振動容量法にて測定した。マイクロトームは、Leica Microsystems 社製のクライオスタット CM1850 を使用した。蛍光画像は、キーエンス製の BZ-X710 All-in-one Fluorescence Microscope、および PerkinElmer 社製の Nuance Multispectral Imaging System により取得した。

第 1 章 実験の部

【1】 6-(6-(Pyridin-2-yl)-1,2-dihydro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-amine (化合物 4) の合成

Blackman らの方法[90]を参考に合成を行った。2-Cyanopyridine (化合物 2、1.00 g、9.60 mmol)および 5-amino-2-cyanopyridine (化合物 3、1.44 g、9.60 mmol) に 64% hydrazine hydrate (4 mL) を加え、90°C で 12 時間還流した。反応溶液を室温に戻し、水を加え、析出した固体をろ取した後に乾燥させた。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=19/1) で精製し、目的物 4 を収量 (収率) 130 mg (5%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[90]。

【2】 6-(6-(Pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-amine (化合物 5) の合成

化合物 4 (50 mg、0.20 mmol) のメタノール溶液に boric acid (24.6 mg、0.40 mmol) の水溶液を加え、室温で一晩攪拌した。反応溶液を減圧濃縮後、クロロホルムで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=9/1) で精製し、目的物 5 を収量 (収率) 23.8 mg (47%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[90]。

【3】 2-Hexadecyl-*N*-(6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)octadecanamide (化合物 1) の合成

2-Hexadecyloctadecanoic acid (63 mg、0.12 mmol) に thionyl chloride (8 mL、0.11 mol) を加え、40°C で 2 時間加熱攪拌した。その後、反応溶媒を減圧留去し、一晩乾燥させて 2-hexadecyloctadecanoyl chloride を得た。そして、化合物 5 (15 mg、0.06 mmol) と 2-hexadecyloctadecanoyl chloride を THF (5 mL) と TEA (12 μ L) と混合し、窒素雰囲気下、70°C で 2 時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去後、中圧分取液体クロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=19/1) で精製し、目的物 1 を収量 (収率) 31.4 mg (71%) で得た。¹H NMR (300 MHz, chloroform-*d*) δ ppm 0.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H), 1.25 (br.s., 56H), 1.73 (br.s, 4H), 2.28 (br.s., 1H), 7.56 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.98-8.03 (m, 1H), 8.63-8.80 (m, 3H), 8.85 (br.s., 1H), 8.96 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, chloroform-*d*) δ ppm 14.3, 22.8, 27.9, 29.5, 29.8, 32.1, 33.2, 49.4, 124.5, 125.4, 126.7, 127.2, 137.7, 141.8, 144.7, 150.3, 151.1, 163.4, 163.7, 175.8. HRMS: *m/z*: calculated for C₄₆H₇₅N₇O [M + H]⁺ 742.6133, found 742.6105.

【4】化合物 **1** と 2-NB との縮合体 (compd. **1-2-NB**) の合成

化合物 **1** (15 mg, 0.02 mmol) と 2-NB (5.7 mg, 0.06 mmol) をクロロホルムに溶解させ、室温で攪拌した。反応溶液がピンク色から黄色に変化した時点を反応の終了とした。溶媒を減圧留去し、中圧分取液体クロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル=1/1) で精製し、目的物を収量 16.2 mg で得た。HRMS: *m/z*: calculated for C₅₃H₈₄N₅O [M+H]⁺ 806.6670 (oxidized form) and C₅₃H₈₆N₅O [M+H]⁺ 808.6827 (cycloadduct), found 806.6662 and 808.6816.

本化合物は、Tz が酸化された化合物と還元された化合物が平衡状態にあるため (Scheme 1-2)、単離は難しいと判断した。したがって、本反応の収率は記載しないこととした。以下、【5】【6】の合成についても同様である。

【5】化合物 **1** と NBCOOH との縮合体 (compd. **1-NBCOOH**) の合成

化合物 **1** (15 mg, 0.02 mmol) と NBCOOH (8.3 mg, 0.06 mmol) をクロロホルムに溶解させ、室温で攪拌した。反応の終了は第 1 章の【4】と同様とした。反応液を 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄後、有機層を減圧留去し、目的物を収量 15.1 mg で得た。HRMS: *m/z*: calculated for C₅₄H₈₄N₅O₃ [M+H]⁺ 850.6569 (oxidized form) and C₅₄H₈₆N₅O₃ [M+H]⁺ 852.6725 (cycloadduct), found 850.6555 and 852.6715.

【6】化合物 **1** と NB(COOH)₂ との縮合体 (compd. **1-NB(COOH)₂**) の合成

化合物 **1** (30 mg, 0.04 mmol) と NB(COOH)₂ (21.9 mg, 0.12 mmol) をクロロホルム/メタノール混合溶液に溶解させ、室温で攪拌した。反応の終了は第 1 章の【4】と同様とした。反応液を減圧留去後、クロロホルムに再溶解し、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄、有機層を減圧留去し、目的物を収量 33.1 mg で得た。HRMS: *m/z*: calculated for C₅₅H₈₄N₅O₅ [M+H]⁺ 894.6467 (oxidized form) and C₅₅H₈₆N₅O₅ [M+H]⁺ 896.6624 (cycloadduct), found 894.6464 and 896.6615.

【7】化合物 **1**, **5** と NB 誘導体との二次反応速度定数 *k*₂ の算出

化合物 **1** および **5** を 1.5 mM となるようにそれぞれメタノールで調製した。2-NB および NBCOOH を 0.75、1.0、1.25、1.5 M となるようにそれぞれメタノールで調製した。Tz 誘導体 (**1**, **5**) と NB 誘導体を 1 : 1 (v/v) の割合で混合し、535 nm の吸光度を 37°C で経時的に測定した (UV-2450 UV-Visible Spectrophotometer)。測定後、時間に対する吸

光度の減少から擬一次反応速度定数 k_{obs} を算出し、NB 誘導体濃度に対して各 k_{obs} をプロットしたグラフの傾きから二次反応速度定数 k_2 を算出した。

【8】化合物 1 を用いたリポソームの作製

薄膜水和-凍結融解-押し出し法によりリポソームを作製した。脂質組成は POPC : 化合物 1 = 16 : 1、8 : 1、または 4 : 1 (mol/mol) とした。比較対照として POPC : DSPC (4 : 1 (mol/mol)) から成るリポソームも作製した。30 mL のナス型フラスコに、クロロホルムに溶解した各脂質溶液を必要量分取し、溶媒を減圧留去することで脂質膜を調製した。その後、一晚真空乾燥することで、クロロホルムを完全に除去した。脂質膜を調製したナス型フラスコに 5% Glucose 水溶液を 1.5 mL 添加し、室温でボルテックスミキサーにより激しく懸濁させた。凍結融解を 4 回繰り返し、その後、ミニエクストルーダーを用いて膜孔 100 nm のポリカーボネート膜に 21 回通過させた。さらに、サイズ排除クロマトグラフィー (PD-10) により、1 mL ずつ溶出させることでリポソームを精製した。リン脂質は、酵素法により定量した (LabAssay Phospholipid)。リポソームの粒子径は動的光散乱法により、ゼータ電位は電気泳動法により測定した (Zetasizer Nano ZS)。測定は室温で行い、粒子径は粒子の個数基準による粒子径分布から算出した平均値によって決定した。

(1) ICG 内封リポソームの調製

脂質膜を調製したナス型フラスコに、ICG 濃度が 100 μM となるように調製した 5% Glucose 溶液を 1.5 mL 添加し、室温でボルテックスミキサーにより激しく懸濁させた。以降の操作は、【8】の基本操作と同様の方法で行った。

(2) 放射性標識リポソームの調製

脂質膜を調製したナス型フラスコに、10 mM DTPA/50 mM HEPES/5% mannitol 緩衝液 (pH 7.4) を 1.5 mL 添加し、室温でボルテックスミキサーにより激しく懸濁させた。その後は、【8】の基本操作と同様の方法でリポソームを調製した。なお、リポソームの精製は、Sephadex G-50 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより行った。

リポソームの放射性標識は、Ogawa らの方法[91]を変更して行った。 $^{111}\text{InCl}_3$ 溶液と 2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を混合したところに、51 mM oxine (8-quinolinol) 溶液を 10 μL 加え、40°C で 10 分間静置した。DTPA 内封リポソームを加え、oxine と DTPA の配位子

交換反応のために 40°C で 10 分間静置した。50 mM EDTA リン酸緩衝液 (pH 8.6) を 100 μ L 加え、室温で 5 分間静置後、Sephadex G-50 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、1 mL ずつ溶出させることでリポソームを精製した。

【9】 POTz-liposome と NB 誘導体との化学反応の進行の確認

POTz-liposome (POPC 終濃度 0.1~0.15 mg/mL) と 2-NB、NBCOOH、あるいは NB(COOH)₂ (各終濃度 20 mM) を 1 : 1 (v/v) の割合でそれぞれ混合し、メタノールで可溶化後に HRMS により解析した。

【10】 *In vitro* 薬物放出評価

(1) ICG による評価

ICG 内封リポソーム (POPC 終濃度 0.5 mg/mL) に 2-NB (終濃度 40 mM)、メタノール、あるいは 5% Glucose を 1 : 1 (v/v) の割合でそれぞれ混合し、ボルテックスミキサーで攪拌後、マルチスペクトラルイメージングカメラ (Nuance) で撮像した。撮像条件は、励起波長 : 670–745 nm、蛍光波長 : 776 nm long-pass、露光時間 : 500 ms とした。

(2) ¹¹¹In-DTPA による評価

¹¹¹In-DTPA 内封リポソーム (POPC 終濃度 0.1~0.15 mg/mL) と 2-NB (終濃度 10~40 mM)、NBCOOH (20 mM)、NB(COOH)₂ (20 mM)、NBane (40 mM)、あるいは生理食塩水を 1 : 1 (v/v) の割合で混合し、ボルテックスミキサーで攪拌後、室温で静置した。混合した 1 分、3 時間、24 時間後にセルロースアセテート電気泳動 (0.8 mA/cm、70 分)、あるいはサイズ排除クロマトグラフィー (PD-10) により、500 μ L ずつ溶出させることで ¹¹¹In-DTPA を内封したリポソームとリポソームから放出された遊離の ¹¹¹In-DTPA に分画した。各フラクションの放射能を測定し、下の式に従い、¹¹¹In-DTPA の放出率を算出した。

Drug release (%) = (radioactivity of free ¹¹¹In-DTPA) / (total radioactivity applied to the cellulose acetate membrane or PD-10 column) \times 100

【11】 環境応答性色素を用いた脂質膜の流動性評価

第 1 章の 【1】 (2) で作製した POTz-liposome の脂質組成に蛍光色素である Laurdan

を 0.5 mol% 添加した。その他のリポソームの作製方法について変更点はない。

リポソーム（脂質終濃度 0.05~0.1 mg/mL）と 2-NB（終濃度 10~40 mM）、NBCOOH（40 mM）、NBane（40 mM）、あるいは生理食塩水を 1 : 1（v/v）の割合でそれぞれ混合し、1 分、3 時間、24 時間後に蛍光強度を室温で測定した（F-7000）。測定は、励起波長を 340 nm とし、400~600 nm の蛍光スペクトルを得た。流動性の指標となる GP 値は以下の式に従って算出した。

$$GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$$

I_{440} : fluorescence intensity at 440 nm

I_{490} : fluorescence intensity at 490 nm

【12】Langmuir 単分子膜を用いた膜物性評価

Langmuir 単分子膜の表面圧 (π) と表面電位 (V) は、25°C で 150 mM NaCl 水溶液上にて測定した。一成分系 (POPC、compd. 1、compd. 1-2-NB、compd. 1-NBCOOH、compd. 1-NB(COOH)₂) および二成分系 (POPC/compd. 1、POPC/compd. 1-2-NB、POPC/compd. 1-NBCOOH、POPC/compd. 1-NB(COOH)₂ (4 : 1 (mol/mol))) の測定物質が 1.0 mM となるようにクロロホルム/メタノール (2 : 1 (v/v)) 混合溶液で調製した。これらの溶液から適量をマイクロシリンジで下相液上に展開し、溶媒が揮発するまで 15 分間静置した。その後、 $\sim 0.08 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1} \text{ min}^{-1}$ の圧縮速度で単分子膜を圧縮した。 π - A 等温線や ΔV - A 等温線に基づき、液体膨張膜から液体凝縮膜へ相転移するときの圧力 (π^{eq}) や膜崩壊時の圧力 (π^c) を決定した。圧縮率の逆数 (Cs^{-1}) や混合による過剰ギブズ自由エネルギーの変化量 (ΔG_{mix}^{exc}) については、以下の式に従って算出した。

$$Cs^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T$$

A : molecular area

π : surface pressure

T : temperature

$$\Delta G_{mix}^{exc} = \int_0^\pi (A_{12} - X_1 A_1 - X_2 A_2) d\pi$$

A : molecular area

X : molar fraction

【13】統計解析

データは平均 ± 標準偏差 (SD) で示した。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) の後、Tukey 法により行った。また、統計的有意差の基準として $p < 0.05$ を採用した。

第2章 実験の部

【1】リポソームの作製

薄膜水和-超音波法によりリポソームを作製した。リポソームの構成脂質には HSPC、PEG-DSPE、Chol、および化合物 **1** を用いた（組成は本論 2-2-1 を参照）。比較対照として化合物 **1** を含まないリポソームも作製した。30 mL のナス型フラスコにクロロホルムに溶解した各脂質溶液を必要量分取し、エバポレーターで溶媒を減圧留去することで脂質膜を調製した。その後、真空乾燥機に入れ一晩置くことで、クロロホルムを完全に除去した。脂質膜を調製したナス型フラスコに PBS を 1.5 mL 添加し、65°C に温めながら、ボルテックスミキサーで激しく懸濁させた。その後、プローブ型超音波発生機（UD-201）で3分間超音波処理した。その後、サイズ排除クロマトグラフィー（PD-10）により、1 mL ずつ溶出させることでリポソームを精製した。リン脂質は、酵素法により定量し、リポソームの粒子径は動的光散乱法により、ゼータ電位は電気泳動法により測定した。

(1) 放射性標識リポソームの調製

第1章の【8】(2)の方法を参考に、修正して行った。

脂質膜を調製したナス型フラスコに、10 mM DTPA/50 mM HEPES/5% mannitol 緩衝液（pH 7.4）を 1.5 mL 添加し、65°C に温めながら、ボルテックスミキサーで激しく懸濁させた。その後、プローブ型超音波発生機で3分間超音波処理した。その後、Sephadex G-50 を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、1 mL ずつ溶出させることでリポソームを精製した。

¹¹¹InCl₃ 溶液と 2 M 酢酸緩衝液（pH 4.5）を混合したところに、51 mM oxine 溶液を 10 μL 加え、40°C で 10 分間静置した。DTPA 内封リポソームを加え、oxine と DTPA の配位子交換反応のために 40°C で 30 分間静置した。以降の操作は、第1章の【8】(2)と同様の方法で行った。

(2) DOX 内封リポソームの調製

脂質膜を調製したナス型フラスコに、250 mM 硫酸アンモニウム水溶液（pH 4.5）を 1.5 mL 添加し、65°C に温めながら、ボルテックスミキサーで激しく懸濁させた。その後、プローブ型超音波発生機で3分間超音波処理した。その後、PD-10 カラムに通し、

リポソームの分散溶媒を PBS に置換した。5 mg/mL に調製した DOX の PBS 溶液を DOX/lipid=75 (g/mol) となるように加え[17]、65°C で 1 時間静置した。その後、サイズ排除クロマトグラフィー (PD-10) により、1 mL ずつ溶出させることで精製した。リン脂質は、酵素法により定量した。DOX の内封率は、1% SDS 溶液を加えてリポソームを可溶化した後、499 nm の吸光度を測定し算出した。

【2】リポソームの安定性評価

¹¹¹In-DTPA 内封リポソーム (HSPC 濃度 2 mM) 50 μL と PBS あるいはマウス血漿 450 μL と混合し、37°C で静置した。24、48 時間後にサイズ排除クロマトグラフィー (PD-10) により、500 μL ずつ溶出させることで ¹¹¹In-DTPA を内封したリポソームとリポソームから放出された遊離の ¹¹¹In-DTPA に分画した。予め、¹¹¹In-DTPA をマウス血漿中でインキュベーションし、サイズ排除クロマトグラフィー (PD-10) により分画すると、遊離の ¹¹¹In-DTPA 画分に高い放射能が検出されることは確認した。各フラクションの放射能を測定し、下の式に従い、¹¹¹In-DTPA のリポソーム内保持率を算出した。

Drug retention (%) = (radioactivity of ¹¹¹In-DTPA in the liposome) / (total radioactivity applied to the PD-10 column) × 100

【3】HSTz-liposome と NB 誘導体との化学反応の進行の確認

第 1 章の【6】の方法を変更して行った。

HSTz-liposome (HSPC 終濃度 0.05 mM) と 2-NB あるいは NBCOOH (各終濃度 20 mM) を 1 : 1 (v/v) の割合でそれぞれ混合し、メタノールで可溶化後に HRMS により解析した。

【4】*In vitro* 薬物放出評価

(1) ¹¹¹In-DTPA による評価

¹¹¹In-DTPA 内封リポソーム (HSPC 終濃度 0.05 mM) と NBCOOH (終濃度 5~20 mM) あるいは PBS を 1 : 1 (v/v) の割合でそれぞれ混合し、ボルテックスミキサーで攪拌後、37°C で静置した。以降は、第 1 章の【10】(2) と同様の方法で分析した。

(2) DOX による評価

DOX 内封リポソーム (HSPC 終濃度 0.05 mM) と 2-NB (終濃度 20 mM)、NBCOOH (5~20 mM)、あるいは PBS を 1 : 1 (v/v) の割合でそれぞれ混合し、ボルテックスミキサーで攪拌後、37°C で暗所に静置した。3、6、24 時間後にサイズ排除クロマトグラフィー (PD-10) により、1 mL ずつ溶出させることで DOX を内封したリポソームとリポソームから放出された遊離の DOX に分画した。各フラクションに 1% SDS 溶液を 1 : 1 (v/v) の割合で加えリポソームを可溶化後、ドキシソルビシン (励起波長 : 485 nm、蛍光波長 : 525 nm) の蛍光強度を測定した。DOX のリポソーム内保持率は、以下の式に従って算出した。

$$\text{Drug retention (\%)} = (\text{fluorescence intensity of DOX in the liposome}) / (\text{fluorescence intensity of DOX in liposome before applying to the PD-10 column}) \times 100$$

【6】細胞培養と担がんモデルマウスの作製

マウス結腸がん細胞 (colon26) とマウスマクロファージ様細胞 (RAW264) は DMEM を培地として、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシンを加えた培養液中で、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

Colon26 細胞を 0.05% トリプシン溶液を用いて回収し、細胞を計数した後に遠心操作 (室温、1,000 rpm、3 分間) を行った後、 1.0×10^6 cells/50 μ L となるように PBS に再懸濁した。細胞懸濁液は氷上で保存して、回収してから可能な限り素早くイソフルラン麻酔下の BALB/c マウス (5 週齢、雄性) の右背部皮下に 27 G の注射針を用いて 50 μ L 移植した。体内動態評価は移植 6 日後、治療実験は移植 5 日後から開始した。

【7】細胞毒性評価

実験の 24 時間前に、Colon26 細胞および RAW264 細胞を 1 well あたり 1.0×10^4 cells となるように 96-well plate (Thermo Fisher Scientific) に播種した。DOX 未封入の HSPC-liposome と HSTz-liposome (HSPC 濃度 0.5~50 mM)、NBCOOH (0.008~8 mM) を培養液で調製し、1 well あたり 100 μ L ずつ添加した。さらに 24 時間後、WST-8 assay (CCK-8) を行い、細胞生存率を算出した。

【8】 リポソームの体内動態評価

第2章の【1】(1)で作製した¹¹¹In-DTPA内封リポソーム(55~74 kBq、総脂質量 0.2 μmol、100 μL)を担がんモデルマウスの尾静脈より投与した。マウスは、投与 6、24、48、72 時間後に屠殺し、血液、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、腸、筋肉、がんを摘出し、それぞれの重量と放射能を測定した。また、投与後 24 時間毎に尿と糞便を採取した。臓器への放射能集積は、% injected dose (% ID) あるいは% ID/g で示した。

【9】¹¹¹In-DTPA の腫瘍内滞留性評価

¹¹¹In-DTPA (37 kBq、5 μL) をイソフルラン麻酔下、担がんモデルマウスのがん組織に直接投与した。投与 3、6 時間後のがんを摘出し、放射能を測定した。直接投与直後のがん組織内放射能を基準として、¹¹¹In-DTPA の腫瘍内滞留率を算出した。

【10】 *In vivo* 薬物放出評価

リポソーム投与後の NB 誘導体の投与量については、以下のように設定した。まずリポソーム(総脂質量 0.2 μmol)の体内動態評価より、静脈内投与 48 時間後のがんへの集積が約 4% ID/g であったことから、リポソーム脂質濃度はがんにおいて約 8 μM と概算された。次に *in vitro* 薬物放出評価の結果より、薬物放出促進には過剰量の NB 誘導体が必要であることが確認された。さらに NB 誘導体の投与液への溶解性を考慮した結果、NB 誘導体の投与量を 8 μmol (200 μL 5% エタノール/PBS) に設定した。NB 誘導体を投与した直後のマウス血漿(約 1 mL)中濃度は 8 mM となり、リポソームに対して過剰量になると想定された。

(1) ¹¹¹In-DTPA 内封リポソームを用いた評価

¹¹¹In-DTPA 内封リポソーム(74 kBq、総脂質量 0.2 μmol、100 μL)を担がんモデルマウスの尾静脈より投与した。投与 48 時間後に vehicle (5% エタノール/PBS)、NBCOOH (8 μmol、200 μL 5% エタノール/PBS)、あるいは NBaneCOOH (8 μmol、200 μL 5% エタノール/PBS) をマウスの尾静脈より投与した。その 6 時間後に屠殺し、各臓器への放射能分布を第2章の【8】と同様の方法で評価した。

(2) DOX 内封リポソームを用いた評価

第2章の【1】(2)で作製したDOX内封リポソームの脂質組成に蛍光脂質であるDiO-C₁₈を0.2 mol% 導入した。その他のリポソームの作製方法について変更点はない。

DiO-C₁₈ 標識 DOX 内封リポソーム (10 mg DOX/kg、200 μL) を担がんモデルマウスの尾静脈より投与した。投与 48 時間後に vehicle あるいは NBCOOH (8 μmol、200 μL 5% エタノール/PBS) をマウスの尾静脈より投与した。その 6 時間後に屠殺し、がんを摘出した。その後、OCT compound (Sakura Fine Technical) 中に包埋し、*n*-ヘキサン/ドライアイスバスを用いて凍結した。クライオスタット (CM-1850) を用いて 10 μm 厚の薄切切片を作製し、蛍光顕微鏡 (BZ-X710) により観察した。測定条件は、DiO-C₁₈ は、励起フィルター：470/40 nm および蛍光フィルター：525/50 nm、DOX は励起フィルター：545/25 nm および蛍光フィルター：605/70 nm を用いた。

【11】 治療実験

マウスに移植したがんの体積が平均 53 mm³ になった時点で、9 つの治療群：(a) PBS + vehicle、(b) PBS + NBCOOH、(c) DOX-HSPC-liposome (5 mg/kg) + vehicle、(d) DOX-HSPC-liposome (5 mg/kg) + NBCOOH、(e) DOX-HSTz-liposome (5 mg/kg) + vehicle、(f) DOX-HSTz-liposome (5 mg/kg) + NBCOOH、(g) DOX-HSTz-liposome (5 mg/kg) + NBaneCOOH、(h) DOX-HSTz-liposome (2.5 mg/kg) + vehicle、(i) DOX-HSTz-liposome (2.5 mg/kg) + NBCOOH に分けて治療実験を開始した。第2章の【1】(2)で作製したDOX内封リポソーム (0~5 mg DOX/kg、200 μL) を担がんモデルマウスの尾静脈より投与した。投与 48 時間後に vehicle、NBCOOH (8 μmol、200 μL 5% エタノール/PBS)、あるいは NBaneCOOH (8 μmol、200 μL 5% エタノール/PBS) をマウスの尾静脈より投与した。治療開始後、がんの体積とマウスの体重を測定した。がんの体積は、以下の式に従って算出した。

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = \text{length (mm)} \times \text{width (mm)}^2 \times 0.5$$

【12】 統計解析

データは平均 ± 標準偏差 (SD) または標準誤差 (SEM) で示した。統計解析は、2 群間の比較は Student's *t* 検定を行った。多群比較では、一元配置分散分析 (ANOVA) の後、Tukey 法により行った。また、統計的有意差の基準として $p < 0.05$ を採用した。

参考文献

- [1] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, D.M. Shin, Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1310–1316 (2008).
- [2] C.M. Dawidczyk, C. Kim, J.H. Park, L.M. Russell, K.H. Lee, M.G. Pomper, P.C. Searson, State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *J. Control. Release*, **187**, 133–144 (2014).
- [3] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, **13**, 238–252 (1965).
- [4] Y. Barenholz, Doxil[®] - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release*, **160**, 117–134 (2012).
- [5] M.E. Price, R.M. Cornelius, J.L. Brash, Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, **1512**, 191–205 (2001).
- [6] Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
- [7] H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 71–79 (2013).
- [8] G.H. Petersen, S.K. Alzghari, W. Chee, S.S. Sankari, N.M. La-Beck, Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin. *J. Control. Release*, **232**, 255–264 (2016).
- [9] M. Li, C. Du, N. Guo, Y. Teng, X. Meng, H. Sun, S. Li, P. Yu, H. Galons, Composition design and medical application of liposomes. *Eur. J. Med. Chem.*, **164**, 640–653 (2019).
- [10] G.J.R. Charrois, T.M. Allen, Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, **1663**, 167–177 (2004).
- [11] K.M. Laginha, S. Verwoert, G.J.R. Charrois, T.M. Allen, Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin. Cancer Res.*, **11**, 6944–6949 (2005).
- [12] B.S. Pattni, V. V. Chupin, V.P. Torchilin, New developments in liposomal drug delivery. *Chem. Rev.*, **115**, 10938–10966 (2015).
- [13] Y. Lee, D.H. Thompson, Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley*

- Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **9**, e1450 (2017).
- [14] Y. Zhao, W. Ren, T. Zhong, S. Zhang, D. Huang, Y. Guo, X. Yao, C. Wang, W.Q. Zhang, X. Zhang, Q. Zhang, Tumor-specific pH-responsive peptide-modified pH-sensitive liposomes containing doxorubicin for enhancing glioma targeting and anti-tumor activity. *J. Control. Release*, **222**, 56–66 (2016).
- [15] C. Zhu, M. Sempkowski, T. Holleran, T. Linz, T. Bertalan, A. Josefsson, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, S. Sofou, Alpha-particle radiotherapy: For large solid tumors diffusion trumps targeting. *Biomaterials*, **130**, 67–75 (2009).
- [16] J.O. Silva, R.S. Fernandes, S.C.A. Lopes, V.N. Cardoso, E.A. Leite, G.D. Cassali, M.C. Marzola, D. Rubello, M.C. Oliveira, A. Luis Branco De Barros, pH-Sensitive, long-circulating liposomes as an alternative tool to deliver doxorubicin into tumors: A feasibility animal study. *Mol. Imaging Biol.*, **18**, 898–904 (2016).
- [17] M. Miyazaki, E. Yuba, H. Hayashi, A. Harada, K. Kono, Hyaluronic acid-based pH-sensitive polymer-modified liposomes for cell-specific intracellular drug delivery systems. *Bioconjugate Chem.*, **29**, 44–55 (2018).
- [18] R. Mo, Q. Sun, N. Li, C. Zhang, Intracellular delivery and antitumor effects of pH-sensitive liposomes based on zwitterionic oligopeptide lipids. *Biomaterials*, **34**, 2773–2786 (2013).
- [19] W. Ong, Y. Yang, A.C. Cruciano, R.L. McCarley, Redox-triggered contents release from liposomes. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 14739–14744 (2008).
- [20] S.C. Davis, F.C. Szoka, Cholesterol phosphate derivatives: Synthesis and incorporation into a phosphatase and calcium-sensitive triggered release liposome. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 783–792 (1998).
- [21] T. Ji, S. Li, Y. Zhang, J. Lang, Y. Ding, X. Zhao, R. Zhao, Y. Li, J. Shi, J. Hao, Y. Zhao, G. Nie, An MMP-2 responsive liposome integrating antifibrosis and chemotherapeutic drugs for enhanced drug perfusion and efficacy in pancreatic cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 3438–3445 (2016).
- [22] J. Banerjee, A.J. Hanson, B. Gadam, A.I. Elegbede, S. Tobwala, B. Ganguly, A. V. Wagh, W.W. Muhonen, B. Law, J.B. Shabb, D.K. Srivastava, S. Mallik, Release of liposomal contents by cell-secreted matrix metalloproteinase-9. *Bioconjugate Chem.*, **20**, 1332–1339 (2009).
- [23] Y. Chi, X. Yin, K. Sun, S. Feng, J. Liu, D. Chen, C. Guo, Z. Wu, Redox-sensitive and hyaluronic acid functionalized liposomes for cytoplasmic drug delivery to osteosarcoma in animal models. *J. Control. Release*, **261**, 113–125 (2017).
- [24] L. Li, T.L.M. Ten Hagen, M. Hossann, R. Süß, G.C. Van Rhoon, A.M.M. Eggermont, D. Haemmerich, G.A. Koning, Mild hyperthermia triggered doxorubicin release from

- optimized stealth thermosensitive liposomes improves intratumoral drug delivery and efficacy. *J. Control. Release*, **168**, 142–150 (2013).
- [25] D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong, M.W. Dewhirst, A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: Characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res.*, **60**, 1197–1201 (2000).
- [26] A.A. Manzoor, L.H. Lindner, C.D. Landon, J.Y. Park, A.J. Simnick, M.R. Dreher, S. Das, G. Hanna, W. Park, A. Chilkoti, G.A. Koning, T.L.M. Ten Hagen, D. Needham, M.W. Dewhirst, Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: Triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors. *Cancer Res.*, **72**, 5566–5575 (2012).
- [27] K. Kono, T. Ozawa, T. Yoshida, F. Ozaki, Y. Ishizaka, K. Maruyama, C. Kojima, A. Harada, S. Aoshima, Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials*, **31**, 7096–7105 (2010).
- [28] S.M. Park, M.S. Kim, S.J. Park, E.S. Park, K.S. Choi, Y.S. Kim, H.R. Kim, Novel temperature-triggered liposome with high stability: Formulation, in vitro evaluation, and in vivo study combined with high-intensity focused ultrasound (HIFU). *J. Control. Release*, **170**, 373–379 (2013).
- [29] Q. Li, W. Li, H. Di, L. Luo, C. Zhu, J. Yang, X. Yin, H. Yin, J. Gao, Y. Du, J. You, A photosensitive liposome with NIR light triggered doxorubicin release as a combined photodynamic-chemo therapy system. *J. Control. Release*, **277**, 114–125 (2018).
- [30] K.A. Carter, S. Shao, M.I. Hoopes, D. Luo, B. Ahsan, V.M. Grigoryants, W. Song, H. Huang, G. Zhang, R.K. Pandey, J. Geng, B.A. Pfeifer, C.P. Scholes, J. Ortega, M. Karttunen, J.F. Lovell, Porphyrin-phospholipid liposomes permeabilized by near-infrared light. *Nat. Commun.*, **5**, 3546 (2014).
- [31] Y. Kono, K. Yokoyama, M. Suzuki, H. Takakura, M. Ogawa, Surface modification of liposomes using IR700 enables efficient controlled contents release triggered by near-IR light. *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 736–741 (2020).
- [32] P.C. Peng, R.L. Hong, Y.J. Tsai, P.T. Li, T. Tsai, C.T. Chen, Dual-effect liposomes encapsulated with doxorubicin and chlorin e6 augment the therapeutic effect of tumor treatment. *Lasers Surg. Med.*, **47**, 77–87 (2015).
- [33] F. Yan, W. Duan, Y. Li, H. Wu, Y. Zhou, M. Pan, H. Liu, X. Liu, H. Zheng, NIR-laser-controlled drug release from DOX/IR-780-loaded temperature-sensitive-liposomes for chemo-photothermal synergistic tumor therapy. *Theranostics*, **6**, 2337–2351 (2016).
- [34] U. Chitgupi, S. Shao, K.A. Carter, W.C. Huang, J.F. Lovell, Multicolor liposome mixtures for selective and selectable cargo release. *Nano Lett.*, **18**, 1331–1336 (2018).

- [35] A. Schroeder, J. Kost, Y. Barenholz, Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, **162**, 1–16 (2009).
- [36] N. Hamano, Y. Negishi, D. Omata, Y. Takahashi, M. Manandhar, R. Suzuki, K. Maruyama, M. Nomizu, Y. Aramaki, Bubble liposomes and ultrasound enhance the antitumor effects of AG73 liposomes encapsulating antitumor agents. *Mol. Pharm.*, **10**, 774–779 (2013).
- [37] R.E. Vandenbroucke, I. Lentacker, J. Demeester, S.C. De Smedt, N.N. Sanders, Ultrasound assisted siRNA delivery using PEG-siPlex loaded microbubbles. *J. Control. Release*, **126**, 265–273 (2008).
- [38] A. Hardiansyah, L.Y. Huang, M.C. Yang, T.Y. Liu, S.C. Tsai, C.Y. Yang, C.Y. Kuo, T.Y. Chan, H.M. Zou, W.N. Lian, C.H. Lin, Magnetic liposomes for colorectal cancer cells therapy by high-frequency magnetic field treatment. *Nanoscale Res. Lett.*, **9**, 1–13 (2014).
- [39] G. Podaru, S. Ogden, A. Baxter, T. Shrestha, S. Ren, P. Thapa, R.K. Dani, H. Wang, M.T. Basel, P. Prakash, S.H. Bossmann, V. Chikan, Pulsed magnetic field induced fast drug release from magneto liposomes via ultrasound generation. *J. Phys. Chem. B*, **118**, 11715–11722 (2014).
- [40] A. Hardiansyah, M.C. Yang, T.Y. Liu, C.Y. Kuo, L.Y. Huang, T.Y. Chan, Hydrophobic drug-loaded PEGylated magnetic liposomes for drug-controlled release. *Nanoscale Res. Lett.*, **12**, (2017).
- [41] M. Bolkestein, E. De Blois, S.J. Koelewijn, A.M.M. Eggermont, F. Grosveld, M. De Jong, G.A. Koning, Investigation of factors determining the enhanced permeability and retention effect in subcutaneous xenografts. *J. Nucl. Med.*, **57**, 601–607 (2016).
- [42] R.K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **7**, 653–664 (2010).
- [43] T.L. Andresen, S.S. Jensen, K. Jørgensen, Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog. Lipid Res.*, **44**, 68–97 (2005).
- [44] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 6974–6998 (2009).
- [45] B.L. Oliveira, Z. Guo, G.J.L. Bernardes, Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 4895–4950 (2017).
- [46] J. Dommerholt, F.P.J.T. Rutjes, F.L. van Delft, Strain-promoted 1,3-dipolar cycloaddition of cycloalkynes and organic azides. *Top. Curr. Chem.*, **374**, 1–20 (2016).
- [47] V. Bouvet, M. Wuest, F. Wuest, Copper-free click chemistry with the short-lived

- positron emitter fluorine-18. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 7393–7399 (2011).
- [48] M. Wang, D. Svatunek, K. Rohlfing, Y. Liu, H. Wang, B. Giglio, H. Yuan, Z. Wu, Z. Li, J. Fox, Conformationally strained trans-cyclooctene (sTCO) enables the rapid construction of ^{18}F -PET probes via tetrazine ligation. *Theranostics*, **6**, 887–895 (2016).
- [49] R. Rossin, M.S. Robillard, Pretargeted imaging using bioorthogonal chemistry in mice. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **21**, 161–169 (2014).
- [50] A.K. Späte, J.E.G.A. Dold, E. Batroff, V.F. Scharf, D.E. Wieland, O.R. Baudendistel, V. Wittmann, Exploring the potential of norbornene-modified mannosamine derivatives for metabolic glycoengineering. *ChemBioChem*, **17**, 1374–1383 (2016).
- [51] E. Saxon, C.R. Bertozzi, Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, **287**, 2007–2010 (2000).
- [52] H.Y. Yoon, M.L. Shin, M.K. Shim, S. Lee, J.H. Na, H. Koo, H. Lee, J.H. Kim, K.Y. Lee, K. Kim, I.C. Kwon, Artificial chemical reporter targeting strategy using bioorthogonal click reaction for improving active-targeting efficiency of tumor. *Mol. Pharm.*, **14**, 1558–1570 (2017).
- [53] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J.W. Chin, Genetically encoded norbornene directs site-specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction. *Nat. Chem.*, **4**, 298–304 (2012).
- [54] R. Rossin, P.R. Verkerk, S.M. Van Den Bosch, R.C.M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M.S. Robillard, In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 3375–3378 (2010).
- [55] O. Keinänen, K. Fung, J.M. Brennan, N. Zia, M. Harris, E. van Dam, C. Biggin, A. Hedt, J. Stoner, P.S. Donnelly, J.S. Lewis, B.M. Zeglis, Harnessing $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ for a theranostic approach to pretargeted radioimmunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 28316–28327 (2020).
- [56] L. Qiu, W. Mao, H. Yin, H. Tan, D. Cheng, H. Shi, Pretargeted nuclear imaging and radioimmunotherapy based on the inverse electron-demand diels-alder reaction and key factors in the pretargeted synthetic design. *Contrast Media Mol. Imaging*, **2019**, 9182476 (2019).
- [57] R. Rossin, T. Lappchen, S.M. van den Bosch, R. Laforest, M.S. Robillard, Diels-Alder reaction for tumor pretargeting: In vivo chemistry can boost tumor radiation dose compared with directly labeled antibody. *J. Nucl. Med.*, **54**, 1989–1995 (2013).
- [58] R.M. Versteegen, R. Rossin, W. Ten Hoeve, H.M. Janssen, M.S. Robillard, Click to release: Instantaneous doxorubicin elimination upon tetrazine ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 14112–14116 (2013).
- [59] M. Xu, J. Tu, R.M. Franzini, Rapid and efficient tetrazine-induced drug release from

- highly stable benzonorbornadiene derivatives. *Chem. Commun.*, **53**, 6271–6274 (2017).
- [60] J.M.M. Oneto, I. Khan, L. Seebald, M. Royzen, In vivo bioorthogonal chemistry enables local hydrogel and systemic pro-drug to treat soft tissue sarcoma. *ACS Cent. Sci.*, **2**, 476–482 (2016).
- [61] J.T. Weiss, J.C. Dawson, K.G. Macleod, W. Rybski, C. Fraser, C. Torres-Sánchez, E.E. Patton, M. Bradley, N.O. Carragher, A. Unciti-Broceta, Extracellular palladium-catalysed dealkylation of 5-fluoro-1-propargyl-uracil as a bioorthogonally activated prodrug approach. *Nat. Commun.*, **5**, 3277 (2014).
- [62] S. Eising, A.H.J. Engwerda, X. Riedijk, F.M. Bickelhaupt, K.M. Bongers, Highly stable and selective tetrazines for the coordination-assisted bioorthogonal ligation with vinylboronic acids. *Bioconjugate Chem.*, **29**, 3054–3059 (2018).
- [63] E.J.L. Stéen, J.T. Jørgensen, C. Denk, U.M. Battisti, K. Nørregaard, P.E. Edem, K. Bratteby, V. Shalgunov, M. Wilkovitsch, D. Svatunek, C.B.M. Poulie, L. Hvass, M. Simón, T. Wanek, R. Rossin, M. Robillard, J.L. Kristensen, H. Mikula, A. Kjaer, M.M. Herth, Lipophilicity and click reactivity determine the performance of bioorthogonal tetrazine tools in pretargeted in vivo chemistry. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **4**, 824–833 (2021).
- [64] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, Post-synthetic modification of DNA by inverse-electron-demand Diels-Alder reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 8846–8847 (2010).
- [65] M. Best, A. Degen, M. Baalman, T.T. Schmidt, R. Wombacher, Two-step protein labeling by using lipoic acid ligase with norbornene substrates and subsequent inverse-electron demand Diels-Alder reaction. *ChemBioChem*, **16**, 1158–1162 (2015).
- [66] A. Ruffoni, M. V. Cavanna, S. Argenti, S. Locarno, S. Pellegrino, M.L. Gelmi, F. Clerici, Aqueous self-assembly of short hydrophobic peptides containing norbornene amino acid into supramolecular structures with spherical shape. *RSC Adv.*, **6**, 90754–90759 (2016).
- [67] Z. Geng, Y. Xi, Click chemistry strategies for the accelerated synthesis of functional macromolecules. *J. Polym. Sci.*, 1–80 (2021).
- [68] V.X. Truong, K.M. Tsang, F. Ercole, J.S. Forsythe, Red light activation of tetrazine–norbornene conjugation for bioorthogonal polymer cross-linking across tissue. *Chem. Mater.*, **29**, 3678–3685 (2017).
- [69] S.E. Coelho, F.S.S. Schneider, D.C. De Oliveira, G.L. Tripodi, M.N. Eberlin, G.F. Caramori, B. De Souza, J.B. Domingos, Mechanism of palladium(II)-mediated uncaging reactions of propargylic substrates. *ACS Catal.*, **9**, 3792–3799 (2019).
- [70] D. Wang, W. Chen, Y. Zheng, C. Dai, K. Wang, B. Ke, B. Wang,

- 3,6-Substituted-1,2,4,5-tetrazines: Tuning reaction rates for staged labeling applications. *Org. Biomol. Chem.*, **12**, 3950–3955 (2014).
- [71] M.R. Karver, R. Weissleder, S.A. Hilderbrand, Synthesis and evaluation of a series of 1,2,4,5-tetrazines for bioorthogonal conjugation. *Bioconjugate Chem.*, **22**, 2263–2270 (2011).
- [72] V.K. Sharma, E. Mamontov, D.B. Anunciado, H. O'Neill, V. Urban, Nanoscopic dynamics of phospholipid in unilamellar vesicles: Effect of gel to fluid phase transition. *J. Phys. Chem. B*, **119**, 4460–4470 (2015).
- [73] B. Moghaddam, M.H. Ali, J. Wilkhu, D.J. Kirby, A.R. Mohammed, Q. Zheng, Y. Perrie, The application of monolayer studies in the understanding of liposomal formulations. *Int. J. Pharm.*, **417**, 235–244 (2011).
- [74] H. Nakahara, M. Hagimori, T. Mukai, O. Shibata, Monolayers of a tetrazine-containing gemini amphiphile: Interplays with biomembrane lipids. *Colloids Surface B Biointerfaces*, **164**, 1–10 (2018).
- [75] J. Massiot, W. Abuilan, O. Kovanolov, A. Makky, Photo-triggerable liposomes based on lipid-porphyrin conjugate and cholesterol combination: Formulation and mechanistic study on monolayers and bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, **1864**, 183812 (2021).
- [76] H. Nakahara, M. Hagimori, T. Mukai, O. Shibata, Interactions of a tetrazine derivative with biomembrane constituents: A Langmuir monolayer study. *Langmuir*, **32**, 6591–6599 (2016).
- [77] F. Pétriat, E. Roux, J.C. Leroux, S. Giasson, Study of molecular interactions between a phospholipidic layer and a pH-sensitive polymer using the Langmuir balance technique. *Langmuir*, **20**, 1393–1400 (2004).
- [78] M.L. Dell'Arciprete, C.J. Cobos, J.P. Furlong, D.O. Mártire, M.C. Gonzalez, Reactions of sulphate radicals with substituted pyridines: A structure-reactivity correlation analysis. *ChemPhysChem*, **8**, 2498–2505 (2007).
- [79] A.C. Knall, M. Hollauf, C. Slugovc, Kinetic studies of inverse electron demand Diels-Alder reactions (iEDDA) of norbornenes and 3,6-dipyridin-2-yl-1,2,4,5-tetrazine. *Tetrahedron Lett.*, **55**, 4763–4766 (2014).
- [80] K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Kawanishi, H. Okuda, Y. Goda, Effects of lipid composition on the properties of doxorubicin-loaded liposomes. *Ther. Deliv.*, **6**, 785–794 (2015).
- [81] T. Parasassi, G. De Stasio, A. d'Ubaldo, E. Gratton, Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.*, **57**, 1179–1186 (1990).
- [82] Z. Zhang, C. Hao, H. Qu, R. Sun, Studied on the dynamic adsorption process of Lycium barbarum polysaccharide in the POPC/DPPC monolayers. *Colloids Surfaces B*

- Biointerfaces*, **178**, 38–43 (2019).
- [83] N.E. Mbua, J. Guo, M.A. Wolfert, R. Steet, G.J. Boons, Strain-promoted alkyne-azide cycloadditions (SPAAC) reveal new features of glycoconjugate biosynthesis. *ChemBioChem*, **12**, 1912–1921 (2011).
- [84] A. Bandekar, S. Sofou, Floret-shaped solid domains on giant fluid lipid vesicles induced by pH. *Langmuir*, **28**, 4113–4122 (2012).
- [85] C. Kirby, J. Clarke, G. Gregoriadis, Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.*, **186**, 591–598 (1980).
- [86] H.I. Kilian, A.J. Pradhan, D. Jahagirdar, J. Ortega, G.E. Atilla-gokcumen, J.F. Lovell, Light-triggered release of large biomacromolecules from porphyrin-phospholipid liposomes. *Langmuir*, **37**, 10859–10865 (2021).
- [87] X. Liang, X. Li, L. Jing, P. Xue, L. Jiang, Q. Ren, Z. Dai, Design and synthesis of lipidic organoalkoxysilanes for the self-assembly of liposomal nanohybrid cerasomes with controlled drug release properties. *Chem. Eur. J.*, **19**, 16113–16121 (2013).
- [88] H. Hatakeyama, H. Akita, H. Harashima, A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: A strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 152–160 (2011).
- [89] S. Yamamoto, A. Kato, Y. Sakurai, T. Hada, H. Harashima, Modality of tumor endothelial VEGFR2 silencing-mediated improvement in intratumoral distribution of lipid nanoparticles. *J. Control. Release*, **251**, 1–10 (2017).
- [90] M.L. Blackman, M. Royzen, J.M. Fox, Tetrazine ligation: Fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13518–13519 (2008).
- [91] M. Ogawa, I.O. Umeda, M. Kosugi, A. Kawai, Y. Hamaya, M. Takashima, H. Yin, T. Kudoh, M. Seno, Y. Magata, Development of ¹¹¹In-labeled liposomes for vulnerable atherosclerotic plaque imaging. *J. Nucl. Med.*, **55**, 115–120 (2014).