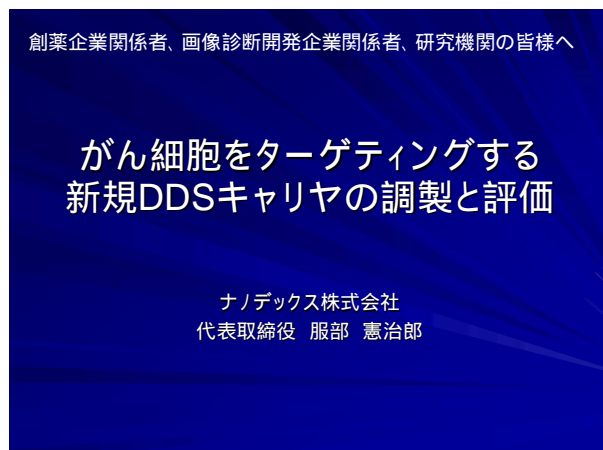


創薬企業関係者および画像診断開発企業関係者、研究機関の皆様へ



ナノデックス社が有する技術のエッセンスをお示しします。前半は大学での研究成果を中心に、後半はその応用について述べます。

### ポイント

- 1) がん細胞表面の受容体と直接に強力に結びつく標的指向性薬物キャリアが大学の基礎研究から開発された。
- 2) そのコンセプトは、受容体との多重相互作用が、「ナノクラスター効果」を発揮して、選択的、かつ強力な会合体を形成した。この物質は制がん剤をも「イソギンチャク効果」により強力に包接した。
- 3) このキャリアは抗原性がなく、小サイズ (<10 nm) で水溶性であるので、細胞間隙浸透性、調製の容易さ、安価などから、がん治療および画像診断用の標的指向性薬物キャリアとして有望である。

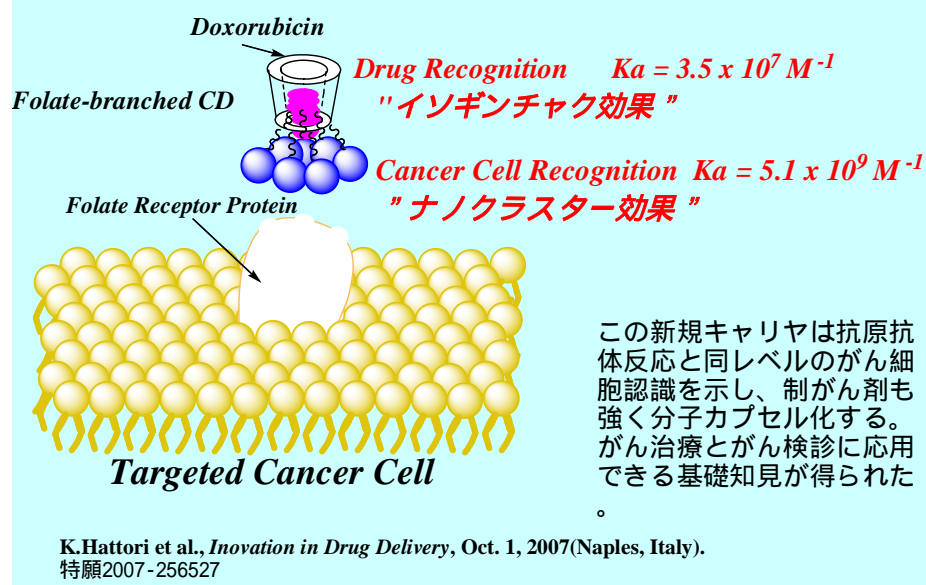
このストーリーのポイントを示しました。

## 研究成果

1. 新規の葉酸7分岐修飾シクロデキストリンが調製できた。
2. 結腸がん細胞 (Caco-2) および制がん剤ドキソルビシンとの選択的で強力な会合がSPR法により示された。
3. 口腔がん細胞 (KB) への取り込みも、フローサイトメトリーおよび共焦点レーザー走査型顕微鏡により示された。
4. 葉酸修飾シクロデキストリンは、がん細胞への標的指向性キャリアとして有望な候補物質であると示唆された。

本研究結果のまとめを示しました。

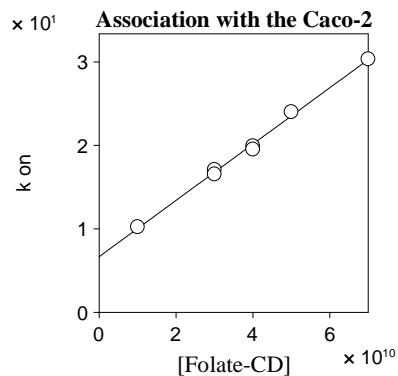
## スキーム：がん細胞ターゲティングDDSキャリアの調製と評価



研究成果のスキームです。葉酸修飾シクロデキストリンが、がん細胞の表面の葉酸レセプターに、抗原抗体反応レベルで会合すること、制がん剤を強くカプセル化してデリバリーできるこ

とを示しています。

### Evaluation of Association Constants of Folate-Modified Cyclodextrin (1) toward the Immobilized Caco-2 and the Immobilized DXR



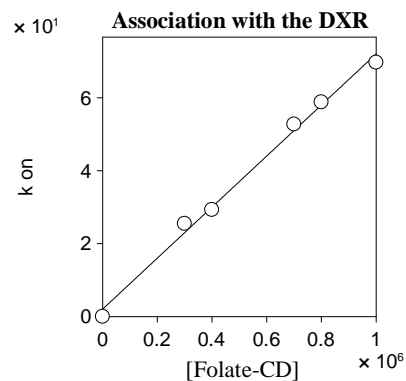
Intercept ( $k_d$ )  $6.7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

Gradient ( $k_a$ )  $3.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Corr Coeff 1.0

$K_a (=k_a/k_d)$   $5.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

Buffer solution:  
PBS including 0.85% NaCl (pH 7.3)



Intercept ( $k_d$ )  $2.0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

Gradient ( $k_a$ )  $7.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

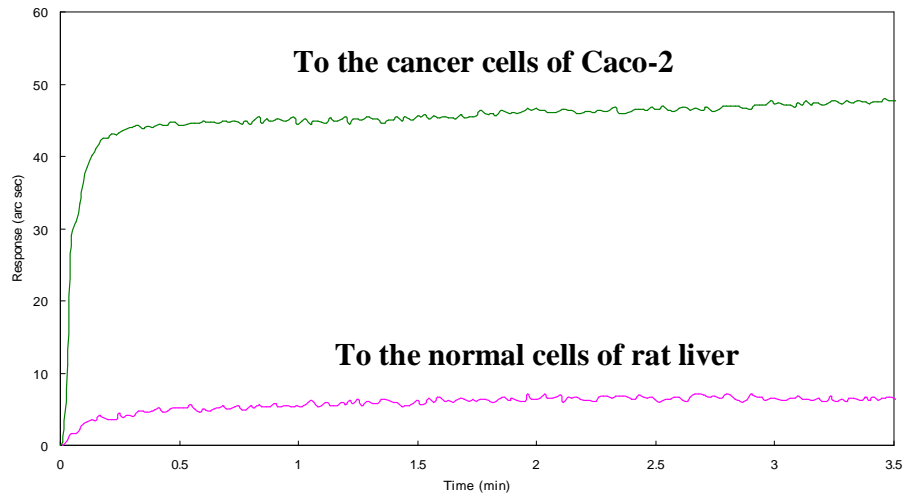
Corr Coeff 1.0

$K_a (=k_a/k_d)$   $3.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$

Buffer solution:  
PBS including 1mM CaCl<sub>2</sub> and 100mM NaCl (pH 7.2)

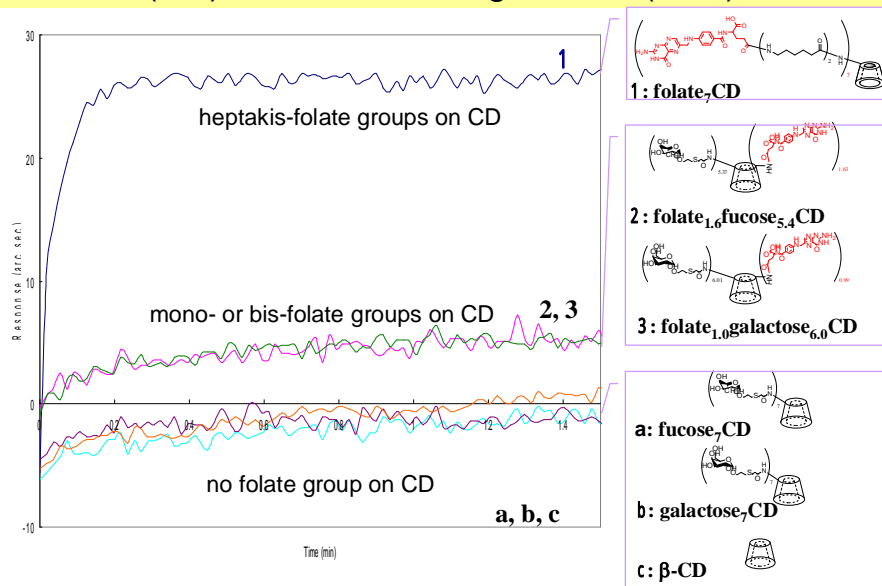
結腸がん細胞 Caco-2 との会合定数および制がん剤ドキシソルピシンの会合定数を求めた時のナマデータです。測定はSPR装置を用いて行われ、直線性が良いことからそれぞれの強い会合を確実性をもって示しています。

## Association Behavior of Heptakis Folate-Modified Cyclodextrin (1) to Caco-2 and Rat Liver Cell



このキャリア物質ががん細胞 Caco-2 に特異的に会合し、正常細胞には物理吸着程度の弱い会合は示すが、殆んど結合しないことを SPR の吸着曲線から示しています。

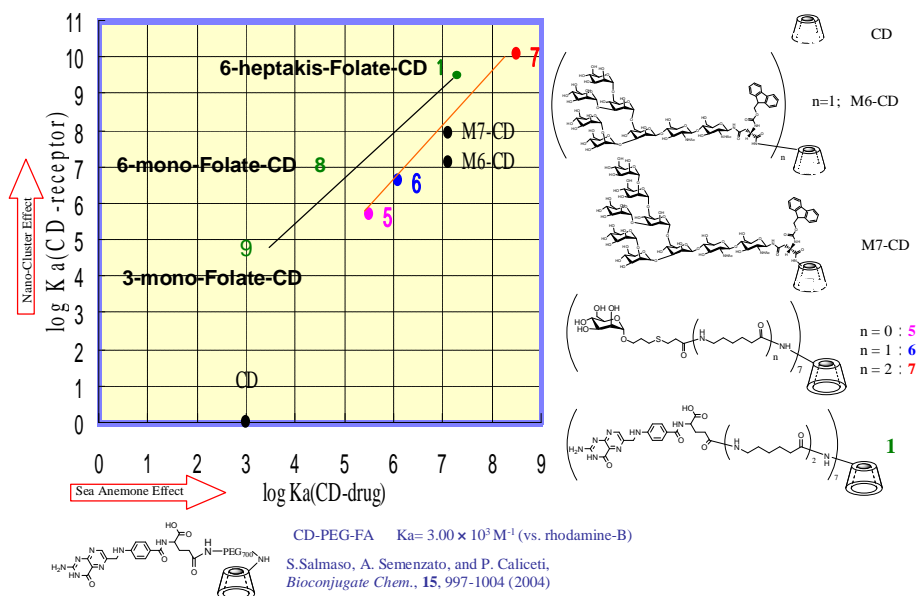
## Association Behavior of Folate-modified Cyclodextrins (1-3) to Folate-Binding Protein (FBP)



シクロデキストリン環上の葉酸分岐の数が重要であることを示しています。化合物 1 は 7 分岐、化合物 2 , 3 は 1 ~ 2 個の平均分岐数、化合物 a,b,c は分岐なしの化合物で、それぞれ葉酸結

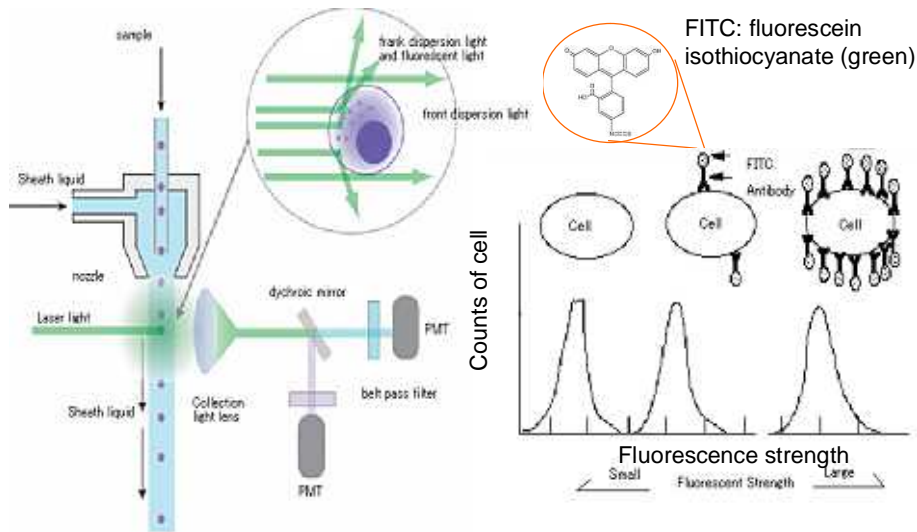
合タンパク (FBP) への会合曲線を示します。

## Two Dimensional Map for Dual Association



次に、葉酸が1個（化合物 8,9）の場合と7個（化合物 1）の場合を比較しました。横軸はドキシソルピシンの会合定数の対数、縦軸はレセプタータンパクとの会合定数の対数を示します。比較のために糖鎖マンノース置換シクロデキストリンや天然の高マンノース型1置換シクロデキストリンの場合、無置換のシクロデキストリンの場合も示しています。

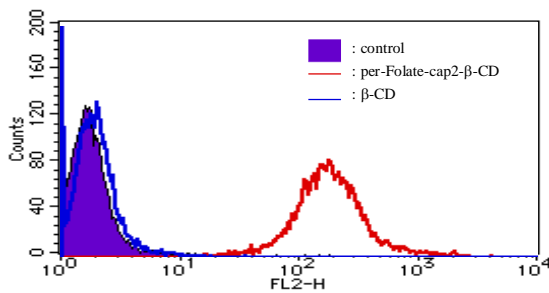
# Procedure of Flow Cytometry



Flow cytometry is a technique to analyze an individual particle for optics.  
Minute particle within a fluid and drain the fluid thin.

細胞への取り込みを調べるためにフローサイトメトリー測定をしました。本図はその原理を示します。蛍光ラベル化したキャリア物質が左の細い管を一通り通過するときその蛍光強度によってソートされて右側のカウンターに記録され、結果をグラフに示すことができます。強い取り込み（横軸）を示した細胞の数（縦軸）で結果が示されます。

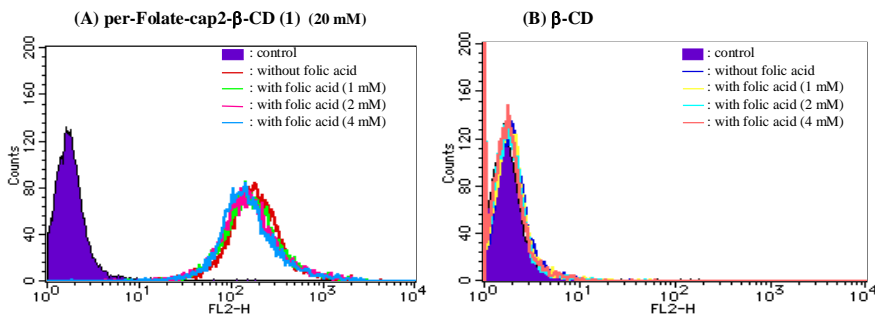
## Cellular Uptake of TRITC-labeled Folate-cap2-CD (1) into KB Cells (37 )



### Protocol

4 x 10<sup>5</sup> cells/well (35 mm dish)  
24 h incubation  
wash x 2  
with or without folic acid  
Addition of samples (20 μM, FSC-)  
1 h incubation (37 )  
wash x 2 with PBS  
Flow cytometry

## Effect of inhibitors on the uptake of TRITC-labeled Folate-cap2-CD (1) into KB cells (37 )



37 でのフローサイトメトリー結果によれば、本キャリアは口腔がん細胞 KB に対して、1 時間の処理で、強烈な取り込みを示すことがよくわかります。フリーの葉酸を 200 倍モル加えても殆んど阻害作用を示すことがないことがわかります。本データは熊本大学薬学部の実験協力により得られました。

#### Intracellular Distribution of TRITC- $\beta$ -CD and TRITC-Folate-cap2-CD (1) in KB cells

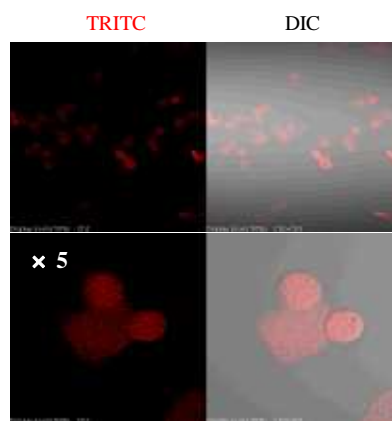
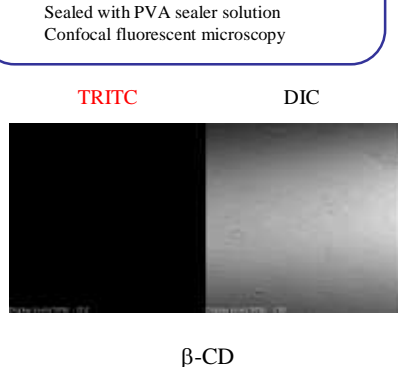
The cells were scanned with a confocal laser scan microscope (CLSM). The cells were added with CDs for 1 h.  
TRITC: tetramethylrhodamine isothiocyanate (red). The concentrations of CDs were 20  $\mu$ M.

##### Protocol

4 x 10<sup>5</sup> cells/well (35 mm dish)  
24 h incubation  
Addition of samples (20  $\mu$ M, FSC-)  
1 h incubation  
wash x 2 with PBS  
Sealed with PVA sealer solution  
Confocal fluorescent microscopy

##### Condition of measurement

Cell : KB cells (folic acid free RPMI medium)  
Sample concentration : 20  $\mu$ M  
Apparatus : OLYMPUS, FLUOVIEW FV300BX



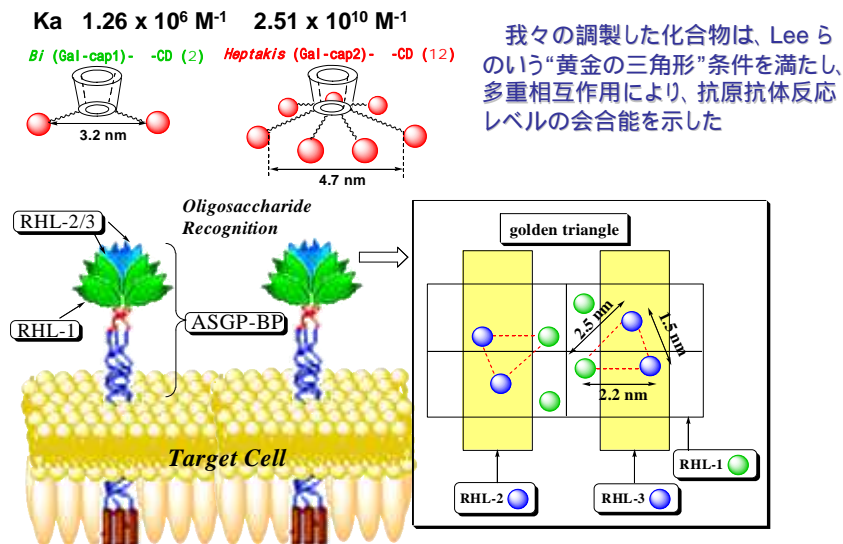
同じく、口腔がん細胞 KB への取り込みを共焦点レーザー走査型顕微鏡により観測しました。1 時間の処理により、蛍光ラベル化したキャリア物質が、細胞全体を真っ赤に染めて取り込まれていることがよくわかります。この顕微鏡は細胞をスライス状に見ているので、細胞の 1/3 以上を占める核にまで到達していることがわかります。このことは、制がん剤を包接したキャリア物質が容易に細胞内部核にまで到達し制がん剤のインターカレーションを容易にしてがん細胞を特異的に死滅させる効果が期待されます。またこのようにがん細胞が赤く染められること自体、内視鏡など画像診断に応用できることを強く示唆しています。

## Progress of Our Investigations for the Targeting Drug Carrier using Saccharide-Modified Cyclodextrins

Glyco-CD	Target	Synthesis			Evaluation		
		Mono-	Di-	Hepta-	lectin	cell	drug
Gal-CD	liver cell (parenchymal)						
Sialo-CD	influenza A virus						
Fucose-CD	large intestine						
Mannose-CD	macrophage liver cell (Kupher)						
Natural mannose-CD	macrophage liver cell (Kupher)						
Natural Sialo-CD	influenza A virus						
Folate-CD	cancer cell						

これまで、研究が行われてきた誘導体の一覧です。糖鎖の種類によってターゲティング細胞が異なり、それぞれの細胞に薬物や造影剤をデリバリーできるものと期待されます。

### ガラクトース多分岐CDによる“糖クラスター効果”の具現化



Y. C. Lee and R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.*, (1995) 28

K. Hattori, A. Kenmoku, et.al, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 2006, 56, 9-16.

ガラクトース 6 分岐シクロデキストリンを用いた研究で、ラット肝細胞に対し  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  という抗原抗体反応レベルの強烈な会合性が見られました。これは既に Lee らによって提唱さ

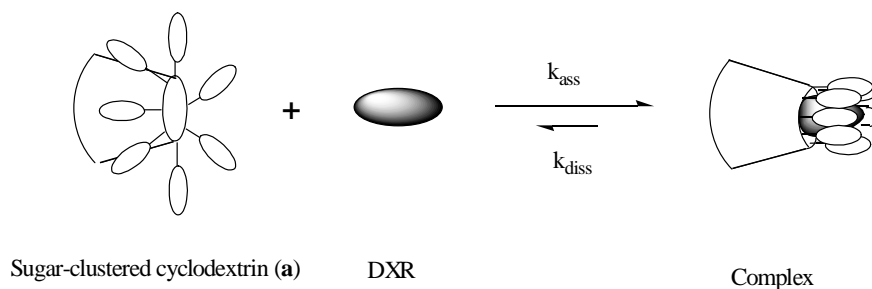


れている糖クラスター効果の具現であると判断しました。すなわち多重相互作用により、相互作用1つ増すごとに指数関数的に会合性が高まるという効果です。

## “イソギンチャク効果”

ドキシソルピシン (DXR) に対する7分岐 Gal-CD の会合スキーム

N. Yasuda, N. Aoki, H. Abe, K. Hattori, *Chem. Lett.*, 2000, 2000, 706-707.



- 1) DXR会合における  $k_d$  の減少のみが会合定数  $K_a$  の増加に寄与した
- 2) 錯体形成に対する分子モデリングによれば、上記の構造がエネルギー極小で安定であった。
- 3) 2D-NMRによれば、CD-DXR錯体構造は閉じたアーム構造を示した。

イソギンチャクが魚を捕らえるように、糖分岐-CDも一度捉えたDXRを放さない

一方、薬物との会合も  $10^7 M^{-1}$  という大きな値を示しました。ちょうど一度捉えた薬物を触手がしっかりとつかんで放さないイソギンチャクの挙動になぞら得られるので、イソギンチャク効果と命名しました。科学的な根拠は、上図に示すように速度論、分子構造エネルギー極小、NMR による構造解析から示された。