高分子キャリアによる細胞内ドラッグデリバリーの新しい展開

特集 がんの分子標的治療

西山伸宏^{*1)}, 片岡一則^{*1,2)}

A new paradigm of intracellular drug delivery using polymeric carriers

Drug delivery system (DDS) is originally aimed to deliver drugs to the target tissue to improve the therapeutic effect as well as minimize the side effects. In addition to such control of biodistribution, another effects of drug carriers on the intracellular drug action have recently been attracting growing interests. It is assumed that drug carriers might control the cell entry as well as the intracellular localization and drug release, thereby affecting the pharmacological activity of the loaded drugs.

This paper reviews recent studies on such mechanisms of intracellular drug action of macromolecular drugs, and focuses were placed on their effects on the gene expressions related to the drug action.

ドラッグデリバリーシステム (DDS) による標的治療は、薬剤の体内動態を制御し、患部選択的に薬剤を集積させることで、治療効果の向上と副作用の軽減を達成することを目的としているが、近年、その細胞レベルでの効果についても注目されるようになってきた。すなわち、薬剤キャリアの利用は、標的局所における薬物の細胞内動態 (取り込み過程、細胞内局在、細胞内での薬剤の放出パターン) に変化をもたらす、薬剤の薬理作用に影響を与えられ、と考えられる。

本稿では、そのような DDS の細胞レベルでの作用メカニズムに関して、遺伝子発現評価を中心とした最近の研究について紹介する。

Nobuhiro Nishiyama^{*1)}, Kazunori Kataoka^{*1,2)}

key words: ドラッグデリバリーシステム (DDS), 薬理作用メカニズム, 薬剤耐性, 遺伝子発現解析, マテリアルゲノミクス

薬剤を「必要なときに、必要な場所で、必要な量だけ作用させる」ことを目的とする DDS は、薬剤の理想的な投与形態として古くから研究が行われており、すでにいくつかの製剤が実用化されてきている。なかでも、水溶性高分子、PEG 化リポソーム、高分子ミセルなどの高分子キャリアを利用したターゲティング型 DDS は、がん治療を中心として非常に高い注目を集めている。

一般的に、高分子キャリアによる標的治療とは、薬剤の体内動態を制御し、患部選択的に薬剤を集積させることで、治療における治療効果の向上と副作用の軽減を達成することを目的としているが、近年、その細胞レベルでの効果についても注目されるようになってきた¹⁻⁶⁾。

すなわち、高分子キャリアの利用は、薬剤の個体レベルでの体内分布のみならず、その細胞内分布や活性型薬剤の作用パターンにも変化をもたらす、薬剤単独とは異なる薬理作用を示す可能性が充分にあると考えられる。さらに、高分子キャリア自身が細胞に作用し、薬剤の活性になんらかの効果を及ぼす可能性もありうる。このような高分子キャリアの細胞レベルでの効果を理解することは、有用な高分子キャリアを設計するうえで、きわめて重要であろう。

このような背景のもとに、本稿では、DDS の細胞レベルでの効果について解説し、併せて筆者らの研究についても簡単に紹介する。

薬物の薬理作用に対する高分子キャリアの効果

高分子-薬剤コンジュゲートや高分子ミセル封入薬剤に代表される高分子ドラッグの細胞に対する作

^{*1)} Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo 東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター・臨床医工学部門

^{*2)} Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻

用について、低分子薬剤と大きく異なるのは、その細胞への取り込みのメカニズムである。すなわち、低分子薬剤は細胞の脂質二分子膜を単純拡散により通過するが、高分子ドラッグはエンドサイトーシスとよばれる膜輸送により細胞内に取り込まれる。このような細胞内への取り込みのメカニズムの差異が、薬剤の薬理作用に大きく影響するものと考えられる。

たとえば、がんの多剤耐性は、耐性細胞の細胞膜表面におけるP-糖蛋白質に代表される膜輸送蛋白質の過剰発現に起因すると考えられており、ABCトランスポーターファミリーに属するそれらの膜輸送蛋白質は、ATP依存的に抗がん剤などの疎水性薬剤を効率的に細胞外へ輸送(efflux)することが知られている。

このようながん細胞の多剤耐性に対して、高分子-薬剤コンジュゲートは、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソーム/リソソーム内で高濃度の薬剤を放出することにより、膜輸送蛋白質による薬剤排出を回避できることが示唆されている^{1,2,7)}。また、poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol) (PEG-PPG-PEG) ブロック共重合体(Pluronic[®])は、臨界ミセル濃度(c.m.c.)以上で高分子ミセルを形成し、疎水的薬剤のキャリアとして機能する一方、c.m.c.以下でP-糖蛋白質の機能を阻害することにより薬剤耐性を克服できる可能性が報告されている^{4,5,8)}。

高分子ドラッグの細胞内局在に関しても、高分子材料の特性やリガンド分子の修飾により異なることが知られている。たとえば、poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) (PEG-PCL) ブロック共重合体から形成された高分子ミセルは、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれたあと、ミセルと平衡状態にあるユニマーがリソソーム膜を不安化することで、細胞質内に移行し、ゴルジ体や小胞体に集積することが報告された⁹⁾。また、光増感剤であるchlorin *e*₆ の poly(L-lysine) (PLL) コンジュゲートはリソソーム内に局在するが、PEG修飾を行うことによりミトコンドリアに集積し、ミトコンドリア膜に直接、光障害を与えることによりチトクロム *c* をリリースさせ、効率的にアポトーシスを誘導する

ことが報告されている¹⁰⁾。この結果は、両親媒性のPEGが高分子ドラッグの細胞内局在を変化させる可能性を示唆するものであろう。

一方、キャリア材料を受容体に対するリガンド分子や抗体およびペプチドで修飾することにより、高分子ドラッグの細胞内局在を制御することも可能である。受容体介在エンドサイトーシス(receptor-mediated endocytosis)により高分子ドラッグが細胞内に取り込まれる場合、修飾するリガンド分子によって細胞内輸送経路(trafficking)が異なることが知られている¹¹⁾。さらに、Tatなどに代表されるprotein transduction domain (PTD)で修飾することにより、エンドサイトーシスを介さない経路によって高分子ドラッグを細胞質に輸送できることも明らかとなってきた¹²⁾。

高分子ドラッグは、上述のような細胞内局在に加えて、コントロールド・リリースにより細胞に対する活性型薬剤の作用パターンも変化させうる。しかしながら、高分子ドラッグは、低分子薬剤(parent drug)と異なる分子標的を有するわけではない。一般的に、薬剤は、その分子標的のみならず、細胞内のさまざまな生体分子(脂質、蛋白質など)と相互作用し、薬剤耐性、解毒、細胞内ストレスなどに関連する遺伝子の発現に影響を与えるものと考えられるが、これらの過程は高分子ドラッグにより制御することが可能であると考えられる。すなわち、高分子ドラッグは、薬剤の細胞内動態を制御し、さらには高分子キャリア自身が薬剤に対する生体反応のモディファイアー(modifier)として機能することにより、薬剤単独とは異なる薬理作用を示すことは充分に考えられる。

近年、このような高分子ドラッグの分子レベルでの新しい作用について、ファーマコゲノミクスの観点から明らかにされつつあり、本稿ではそれらの研究の一部と筆者らの研究を簡単に紹介する。

HPMA 共重合体-薬剤コンジュゲート

米国ユタ大学薬学部のKopecekらは、N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) 共重合体と制がん剤ドキソルビシンの複合体(PHPMA-

図1 PHPMA 共重合体-ドキソルビシン (Dox) コンジュゲート (PHPMA-Dox) のがん組織に対する作用メカニズム (Minko T et al., 2000²⁾より改変)

Dox)の薬理作用とその遺伝子発現変化について詳細な研究を行っている^{1, 2, 13)}。彼らの研究では、卵巣がん A2780 細胞の Dox 感受性および耐性株を皮下移植したマウスに対し、Dox 単独および PHPMA-Dox を投与したところ、Dox は感受性株のみに対し有意な抗腫瘍効果を示したが、PHPMA-Dox は感受性および耐性株のどちらの細胞に対しても顕著な抗腫瘍活性を示し、腫瘍の退縮が確認された²⁾。

Dox と PHPMA-Dox の違いは、まず腫瘍血管において認められた。すなわち、Dox の投与は vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を上昇させ、血管の物質透過性を高める一方で、腫瘍血管は無処理群と同様に不均一なままであった。これに対し、PHPMA-Dox の投与は VEGF の発現を減少させ、薬剤の腫瘍からの漏出を抑制する一方で、均一な腫瘍血管の構築を惹起し、腫瘍全体における PHPMA-Dox の集積が観察された^{2, 13)}。PHPMA-Dox による処理では、アポトーシスと同時にネクローシスも顕著に起こっていることが確認されている²⁾。

さらに、がん細胞に対して Dox と PHPMA-Dox は、以下のように異なる遺伝子発現を示した^{1, 2)}。

- ① Dox による処理は、ストレス因子、解毒酵素および DNA 修復酵素に関連する遺伝子群 (HSP70, GST-P, BUDP, Topo-II α , β , TK-1) の発現を上昇させたが、PHPMA-Dox による処理はそれらの発現を減少させた。

図2 Dox および Dox 内包 Pluronic ミセル (Dox-P85) の作用による MCF-7 細胞の遺伝子発現変化 (Kabanov AV et al., 2005⁴⁾より改変)

- ② PHPMA-Dox による処理は、Dox による処理と比較して、アポトーシス関連遺伝子 (p53, c-fos, c-jun, Apaf-1, caspase-9) の発現を顕著に上昇させた。また、PHPMA-Dox による処理は、抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現を減少させた。
- ③ Dox による処理は、薬剤排出蛋白質 (MDR1, MRP) の発現を上昇させたが、PHPMA-Dox による処理はそれらの発現を減少させた。

そのうえ、PHPMA-Dox で処理したがん細胞は、低酸素状態 (hypoxia) となり、嫌氣的エネルギー代謝が起こることが示唆され、上述の遺伝子発現に影響を与えていると考えられる^{2, 3)}。

以上の現象を整理すると、PHPMA-Dox は、固形がん集積したあと、腫瘍血管の構築に作用することで腫瘍内に均一な薬剤の集積を達成する一方、がん細胞の薬剤耐性および解毒関連遺伝子の発現を抑制し、さらにアポトーシスシグナルを活性化することで、耐性株に対しても顕著な抗腫瘍活性を示すものと考えられる (図1)。

さらに、Kopecek らは、heat shock protein 90 (HSP90) 阻害剤であるゲルダナマイシン誘導体 (17-(3-aminopropylamino)-17-demethoxy

図3 シスプラチン内包高分子ミセル(CDDP/m)の形成(a)と異なる pH の 150 mM NaCl 水溶液中における高分子ミセルからの CDDP のリリース(b)

geldanamycin : APGA) と, その HPMA 共重合体コンジュゲート(PHPMA-APGA)の A2780 細胞に対する作用についても検討を行っている³⁾. APGA と PHPMA-APGA はともに, HSP90 のクライアント蛋白質である C-Raf のプロテアソーム分解を促進し, CDK-4 の発現抑制や Apaf-1 の発現上昇などの同様なメカニズムを介して細胞増殖を抑制した.

しかしながら, APGA と PHPMA-APGA は異なるストレス反応を示し, APGA による処理は, 細胞のアポトーシスおよびネクローシス耐性に関連する HSP27 および HSP70 の発現を上昇させたが, そのようなストレス因子の過剰発現は, PHPMA-APGA による処理では確認されなかった³⁾. このように, HPMA 共重合体-薬剤コンジュゲートは細胞のストレス反応を抑制し, 効率的に細胞死を誘導できるものと考えられる.

HPMA 共重合体-薬剤コンジュゲートは, 薬剤と HPMA 共重合体が入浴剤内のシステインプロテアーゼの一つであるカテプシン B により選択的に切断されるペプチドスパーサーで結合されており, 細胞外では不活性なプロドラッグであるが, 細胞内では高濃度の活性型薬剤を放出することが出来る. 一般的に, 形質膜表面には外部環境に感受性の脂質および蛋白質が多く存在し, 薬剤などの作用により耐性メカニズムの活性化やストレス反応な

どの細胞の生体防御機構が惹起されるものと考えられる. これに対し, HPMA 共重合体-薬剤コンジュゲートは細胞内で活性型薬剤を放出することにより, ギリシャ神話のトロイの木馬のように, 細胞の生体防御機構を回避して効率的に細胞死を誘導できるものと推察される.

薬剤・遺伝子デリバリーにおける Pluronic の効果

両親媒性の A-B-A ブロック共重合体である Pluronic (poloxamer という名前でも知られている) は, c.m.c. 以上で高分子ミセルを形成し, 疎水性薬剤の担体として機能する一方, c.m.c. 以下でユニマーが細胞膜と相互作用することによって, 二分子膜の流動性の低下や細胞内 ATP 量の減少を惹起し, さらに ATP の ABC トランスポーターへの結合を阻害することで, 多剤耐性細胞の疎水性薬剤に対する感受性を高めることが示唆されている^{4,5,8)}.

この Pluronic による細胞内 ATP 量の減少は, Pluronic が細胞膜を通過し, ミトコンドリア膜に相互作用することで, 呼吸鎖複合体を破壊するためではないかと考えられている⁴⁾. その結果, Pluronic による処理で他の ATP 依存的薬剤耐性および解毒機構 (glutathione-S-transferase (GST) など) も不活性化されることが示されている⁴⁾. すなわち, Pluronic はキャリア材料自身が薬剤の生体反応のモ

ディファイアーとして機能すると考えられている。

前述の HPMA 共重合体-薬剤コンジュゲートと同様に、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞に対して、Dox および Dox-Pluronic ミセル封入体(Dox-P85)を作用させたときの遺伝子発現を評価したところ、両者の間に特徴的な違いが観察された(図 2)⁴⁾。

すなわち、Dox による処理は、薬剤排出蛋白質(MDR1, MDR3)、解毒酵素(CYP450, TXNRD, SOD1)、増殖因子(CTGF)の発現を上昇させたが、そのような遺伝子群の発現上昇は Dox-P85 による処理では認められなかった。この結果は、Dox による処理はがん細胞を増悪させるが、Dox-P85 による処理はそのような細胞の生体防御反応を惹起しないものと考えられる。実際に、MCF-7 細胞を低濃度の Dox の存在下で培養すると、細胞は Dox 耐性を獲得し、P-糖蛋白質の発現が上昇するが、c.m.c. 以下の濃度の Pluronic を共存させることにより P-糖蛋白質の発現上昇が惹起されないことが報告されている⁴⁾。

一方、Dox-P85 による処理では、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体に関連する遺伝子群(NRF1, SDHC, Cox11, TNFSF10A)やアポトーシスおよびネクローシスに関連する遺伝子群(PDCD5, TNFRSF8, TNFSF10A)の特異的な発現上昇が認められ、これらは Dox-P85 の作用メカニズムに関連しているものと推察される。

近年、遺伝子治療のための遺伝子のベクター(キャリア)開発が大きな注目を集めているが、Pluronic は、プラスミド DNA の筋肉注射やポリプレックス(カチオン性高分子/DNA 複合体)を利用した遺伝子導入において、その遺伝子発現効率を上昇させることが報告され^{14,15)}、Pluronic の新しい効果として注目されている。とりわけ、プラスミドの筋肉注射において、Pluronic はその発現効率を 10 倍に上昇させる(エレクトロポレーションと同程度)だけでなく、発現期間も長期化させることが示された¹⁴⁾。

現在までのところ、このような Pluronic による遺伝子発現の上昇は、ベクターの輸送効率に関係しているのではなく、Pluronic の細胞に対するなんらかの作用によって、導入遺伝子の転写効率が高まっているためであると考えられている。すなわち、

図 4 CDDP および CDDP/m を 6 時間および 12 時間作用させた場合のヒト肺がん PC-14 細胞の遺伝子発現変化(クラスター解析)

種々のルシフェラーゼ遺伝子安定発現細胞に対しても Pluronic を作用させることにより、ルシフェラーゼ発現量が有意に上昇することが示されている⁴⁾。

プラスミド DNA の筋肉注射の実験においては、Pluronic の効果はプラスミドのプロモーター配列に依存しており、CMV および NF- κ B をプロモーターとして有するプラスミドに対しては、その遺伝子発現をそれぞれ 1,000 倍および 740 倍に上昇させるが、SV-40 および AP-1 を有するプラスミドの遺伝子発現の上昇はそれぞれ 230 倍および 90 倍であった⁴⁾。

Pluronic のこのような効果に着目し、比較的高い遺伝子導入効率を示すカチオン性高分子として知られるポリエチレンイミンを、Pluronic で修飾した新しい遺伝子デリバリーシステムが、Kabanov らによって開発されている^{16,17)}。これらの Pluronic の効果に関する詳細なメカニズムはいまだ明らかにさ

図5 主成分解析による(a)因子負荷量分布図と(b)主成分得点分布図

れていないが、Pluronicの生体反応のモディファイアーとしての新しい機能は注目に値するであろう。

シスプラチン内包高分子ミセル

筆者らも、このような高分子キャリア封入薬剤の薬効発現メカニズムにいち早く着目し、国立がんセンター研究所薬効試験部 西尾和人博士との共同研究により、シスプラチン(CDDP)とシスプラチン内包ミセル(CDDP/m)の作用(90%増殖阻止濃度(IC_{90})で培養)によるヒト非小細胞肺癌PC-14細胞の培養6時間および12時間後の遺伝子発現変化を遺伝子アレイにより解析した⁶⁾。

CDDP/mは、白金(II)原子の配位子交換反応によるCDDPとPEG-poly(glutamic acid)(PEG-P(Glu))共重合体の高分子-金属錯体形成を駆動力として形成され(図3)、生理的濃度の塩素イオン(Cl^-)を含有する水溶液中においてCDDPがスローリリースされることが確認されている¹⁸⁾。この高分子ミセルからのCDDPの放出速度は、生理的pH条件からpHが低下(pH7.4→pH5.2)することによって加速化され、その結果、CDDP/mは細胞内低pH環境にตอบสนองしたCDDPリリースを実現するものと考えられる⁶⁾。

図4に示すように、807個の遺伝子発現のクラスター解析の結果、CDDP-6hとCDDP-12hの発現パターンが最も類似しており、CDDP/mの発現パターンは、時間の経過とともにCDDPの発現パターンに近づくことが確認された⁶⁾。この結果は、高

分子ミセルから放出されたCDDPが薬効を示すことを示唆していると考えられる。しかしながら、非常に興味深いことに、いくつかの遺伝子がCDDPとCDDP/m間でまったく逆の発現を示した(図4)。

これらの遺伝子発現の結果を主成分解析により、さらに解析した結果を図5に示す。図5aの因子負荷量分布図において、第一および第二主成分は、それぞれCDDPとCDDP/mの差異および培養時間の効果を示唆していると考えられ、固有値の寄与率はそれぞれ52.6%および27.4%であった⁶⁾。図5bの主成分得点分布図において、第一主成分を規定する遺伝子を抽出したところ、integrin familyやmatrix metalloproteinases (MMPs)などのがん細胞の浸潤や転移に関連する遺伝子群がCDDPによる処理で過剰発現するのに対して、CDDP/mによる処理ではそれらの遺伝子の発現が抑制されることが確認された⁶⁾。この結果は、高分子ミセルという高分子キャリアを用いることにより、CDDPの薬理作用が変化する可能性を示唆するものであると筆者らは考えている。

おわりに

従来のDDS研究では、薬剤キャリアは薬物を患部まで輸送するたんなる“運び手”として考えられてきたが、薬剤キャリアは、そのような薬物の体内動態を制御するだけでなく、標的局所における薬物の細胞内動態(取り込み過程、細胞内局在、細胞内での薬剤の放出パターン)に変化をもたらすこと

で、薬剤の薬理作用を積極的に変化させる可能性がある。

薬剤キャリアのなかには、Pluronicのようにキャリア材料自身が細胞に直接作用し、内包された薬剤の薬効を変化させるものも存在し、このような材料はたんなる薬物の運び手ではなく、薬物に対する細胞の反応を制御するモディファイアーとして機能する。このような材料による生体反応の変化は、DDSのキャリア材料に限定されるものではなく、再生医療などの目的において生体とのインターフェースで利用されるすべての材料に対して考慮すべきである。

したがって、遺伝子発現レベルで材料特性と生体反応の相関を解明することはバイオマテリアル、DDSの研究分野において重要な課題であると考えられる。この新しい研究分野は“マテリアルゲノミクス”および“ポリマーゲノミクス”とよばれている。この分野の研究が今後大きく発展すれば、生体反応の観点からDDSや再生医療のための新しい生体材料を設計し、生体の機能を任意に制御することが可能になるものと期待される。

文 献

- 1) Minko T, Kopeckova P, Kopecek J : Comparison of the anticancer effect of free and HPMA copolymer-bound adriamycin in human ovarian carcinoma cells. *Pharm Res* 16 : 986-996, 1999.
- 2) Minko T, Kopeckova P, Kopecek J : Efficacy of the chemotherapeutic action of HPMA copolymer-bound doxorubicin in a solid tumor model of ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 86 : 108-117, 2000.
- 3) Nishiyama N, Nori A, Malugin A, Kasuya Y, Kopeckova P et al. : Free and N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer-bound geldanamycin derivative induce different stress responses in A2780 human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 63 : 7876-7882, 2003.
- 4) Kabanov AV, Batrakova EV, Sridibhatla S, Yang Z, Kelly DL et al. : Polymer genomics : shifting the gene and drug delivery paradigm. *J Controlled Release* 101 : 259-271, 2005.
- 5) Minko T, Batrakova EV, Li S, Li Y, Pakunlu RI : Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells. *J Controlled Release* 105 : 269-278, 2005.
- 6) Nishiyama N, Koizumi F, Okazaki S, Matsumura Y, Nishio K et al. : Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin- and cisplatin-incorporated polymeric micelles. *Bioconjugate Chem* 14 : 449-457, 2003.
- 7) Miyamoto Y, Maeda H : Comparison of the cytotoxic effects of the high- and low-molecular weight anticancer agents on multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells *in vitro*. *Cancer Res* 50 : 1571-1575, 1990.
- 8) Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY et al. : Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers : selective energy depletion. *Br J Cancer* 85 : 1987-1997, 2001.
- 9) Savic R, Luo L, Eisenberg A, Maysinger D : Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science* 300 : 615-618, 2003.
- 10) Hamblin MR, Miller JL, Hasan T : Pegylation of a chlorin *e₆* polymer conjugate increases tumor targeting of photosensitizer. *Cancer Res* 61 : 7155-7162, 2001.
- 11) Sheff D : Endosomes as a route for drug delivery in the real world. *Adv Drug Deliv Rev* 56 : 927-930, 2004.
- 12) Nori A, Kopecek J : Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 57 : 609-636, 2005.
- 13) Minko T, Kopeckova P, Pozharov V, Jensen K, Kopecek J : The influence of cytotoxicity of macromolecules and of VEGF gene modulated vascular permeability on the enhanced permeability and retention effect in resistant solid tumors. *Pharm Res* 17 : 505-514, 2000.
- 14) Lemieux P, Guerin G, Paradis G, Proulx R, Chistyakova L et al. : A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 7 : 986-991, 2000.
- 15) Astafueva I, Maksimova I, Lukanidin E, Alakhov VY, Kabanov AV : Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with Pluronic P85 block copolymer. *FEBS Lett* 389 : 278-280, 1996.
- 16) Nguyen HK, Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, Guerin N et al. : Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther* 7 : 126-138, 2000.
- 17) Gebhart CL, Sridibhatla S, Vinogradov S, Lemieux P, Alakhov VY et al. : Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer. *Bioconjugate Chem* 13 : 937-944, 2002.
- 18) Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y et al. : Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res* 63 : 8977-8983, 2003.