レクチン固定化蛍光ナノスフェアを用いた大腸がんの超早期診断法の開発

特集 経口デリバリーへの新しいチャレンジ

佐久間信至^{*1)}, 日渡謙一郎^{*2)}, ロバート ホフマン^{*3)}, 山下伸二^{*1)}

Diagnosis of early colorectal cancer using lectin-immobilized fluorescent nanospheres

Peanut agglutinin (PNA)-immobilized polystyrene nanospheres with surface poly (N-vinylacetamide) (PNVA) chains encapsulating coumarin 6 were designed as a novel colonoscopic imaging agent. PNA was a targeting moiety that binds to β -D-galactosyl-(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine, which is the terminal sugar of the Thomsen-Friedenreich antigen that is specifically expressed on the mucosal side of colorectal cancer cells. PNVA was immobilized with the aim of reducing nonspecific interactions between imaging agents and normal tissues. Coumarin 6 was encapsulated into nanosphere cores to provide endoscopically detectable fluorescence intensity. It is anticipated that the lectin-immobilized fluorescent nanospheres specifically accumulate on the surface of tumor tissues in the large intestine with resulting fluorescence. Real-time and accurate diagnosis of small-sized early colorectal cancer can be then achieved through observation of a clear fluorescence contrast between the normal and tumor tissues using the florescent endoscopy.

大腸粘膜内に留まる転移リスクのない発生初期の大腸がんをリアルタイムに診断し、内視鏡下で切除することを可能にする世界初の大腸内視鏡検査用造影剤を開発する。造影剤は、がん化に伴い大腸粘膜上に発現する特異抗原の末端糖鎖を認識するピーナッツレクチンおよび正常部位との非特異的相互作用を抑制するポリ N-ビニルアセトアミドを表面に固定化し、クマリン6を内包したレクチン固定化蛍光ナノスフェアである。内視鏡下、大腸粘膜上のがん病変に集積した造影剤の蛍光に由来するがん組織(明部)／正常組織(暗部)のコントラストに基づき、がんを診断する。

Shinji Sakuma^{*1)}, Ken-ichiro Hiwatari^{*2)}, Robert M Hoffman^{*3)}, Shinji Yamashita^{*1)}

key words : colorectal cancer, diagnosis, colonoscopy, lectin, nanospheres

大腸がんは、肺がんおよび乳がんと共に並び、先進諸国において罹患率の高いがんである^{1,2)}。大腸粘膜側からがんは発生し、粘膜下組織への浸潤、リンパ節転移、肝臓や肺への遠隔転移を経て、患者を死に至らしめる。表1に示すように、治療法の第一選択は手術による病巣部位切除であり、粘膜内に留まる早期にがんを切除した場合、完全治癒が期待される。

転移性大腸がんに対する化学療法として、5-Fluorouracil, Leucovorin および Irinotecan を併用する FOLFIRI 療法, Irinotecan の代わりに Oxaliplatin を用いる FOLFOX 療法が標準的に用いられ

表1 代表的な大腸がんのステージ分類と優先される治療法

Stage	がんの浸潤の程度	優先される治療法
0 期	がんが粘膜にとどまるもの	内視鏡的治療
1 期	がんが大腸壁にとどまるもの	外科療法
2 期	がんが大腸壁を超えているが、隣接臓器に浸潤していないもの	外科療法
3 期	リンパ節転移のあるもの	外科療法
4 期	腹膜、肝、肺などへの遠隔転移のあるもの	化学療法、放射線療法

る³⁾。近年、抗体医薬の Bevacizumab あるいは Cetuximab の併用も行われ、化学療法の治療成績も改善されているが、がんの進行度が大腸がん全体の治療成績に大きく影響していることはいまま変わらない⁴⁾。

現行の大腸がん治療において、早期発見・切除は、疑いなく最善の治療法である。大腸がんのスク

^{*1)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University 摂南大学薬学部

^{*2)} Advanced Materials R & D Laboratory, R & D Division, ADEKA Co. (株)ADEKA 研究開発本部先端材料開発研究所

^{*3)} AntiCancer Inc. & Department of Surgery, University of California at San Diego アンチキャンサー(株) & カリフォルニア大学サンディエゴ校

図1 内視鏡的粘膜切除(EMR)の概略

リーニングとして便潜血検査が用いられており、陽性者に対して大腸内視鏡検査や注腸造影検査などの2次精検が行われる^{5,6)}。大腸がんの確定診断手法は大腸内視鏡検査であることから、最初から本検査を受診するケースも少なくない。

大腸内視鏡検査時にポリープ等の病変が認められた場合、組織生検や治療の目的で病変は切除される^{6,7)}。茎のあるポリープでは、ループ状の細いワイヤーを茎にかけて高周波電流で焼き切るポリペクトミーが、無茎性のポリープや腫瘍では、図1に示すように、病変の下層部に生理食塩液等を注入し、周辺の広い範囲の粘膜を浮き上がらせたのち、その範囲の粘膜を高周波電流で焼き切る内視鏡的粘膜切除術(endoscopic mucosal resection: EMR)が用いられる。また、病変が大きい場合、電気メスを用いて病変を徐々にはぎ取る内視鏡的粘膜下層剥離術(endoscopic submucosal dissection: ESD)も応用されている。大腸粘膜内に留まる、あるいは脈管系への浸潤がない粘膜下層に留まる早期がんの治療において、これらの内視鏡的手法はきわめて有用である。標準的な大腸内視鏡では、がんのタイプ等にもよるが、1cm程度のがんから検出できる。しかし、この大きさのがんは他臓器への転移リスクがうたがわれ、より早期の発見が望まれている⁸⁾。

このような現況下において、筆者らは、大腸内視鏡診断・治療と組み合わせ、大腸がんの超早期高精度診断を可能とする国際標準化手法を確立することを最終ゴールとして、大腸粘膜内に留まる転移リスクのない発生初期の大腸がんをリアルタイムに診断し、内視鏡下で切除することを可能にする世界初の大腸内視鏡検査用造影剤の開発を目指している^{9~11)}。大腸内視鏡の装備や医師の技量、がんの個体差等に依存しない高精度の大腸がん診断を実現するツールとして、同造影剤の開発はきわめて重要であると考えている。

大腸がんの早期発見に対する取組み

拡大内視鏡など、大腸がんを早期に発見する手法として、内視鏡の改良が中心に進められてきた¹²⁾。最近では、大腸粘膜上の微小病変の発見およびリアルタイム診断を実現するため、narrow band imagingなど、がん特異的な変化を特殊光で観察し、可視化する技術を組み入れた内視鏡も開発されている^{12,13)}。また、経済財政改革の基本方針2008に基づき創設された革新的技術特区(スーパー特区)では、消化器内視鏡先端医療開発プロジェクトが先端医療開発特区に採択され、高磁場画像診断に用いるMR内視鏡等の研究開発も進められている。しかし、現状では、内視鏡診断は医師の技量によるところが依然として大きく、また、最新技術を駆使しても、がん組織/正常組織の完全な見極めは達成されていない。

造影剤もまた、高確度・リアルタイムの大腸がんの早期診断を実現する選択肢の一つである。(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構の「ナノ医療デバイス開発プロジェクト」では、がんを特異的に認識する分子に蛍光を結合させた造影剤を血管内投与し、体外から近赤外光を照射してがんに集積した造影剤の蛍光を検出する近赤外蛍光撮影用の造影剤が検討された。Harvard Medical Schoolの研究グループも、同様の目的で、大腸がんの早期診断に用いる血管内投与用の内視鏡下造影剤を検討した¹⁴⁾。

一方、造影剤を用いたがん診断の画像化手法の大きな問題点として、がん細胞に特異的に集積するプローブを用いても、がん細胞に取り込まれるプローブは投与量の極一部で、大部分のプローブが全身に分布することから、バックグラウンドに分布したプローブの影響によって小さながん病変を確実に検出することがほとんど不可能であることが指摘されてきた。この問題に対して、近年、東京大学とNational

図2
大腸内視鏡検査用造影剤の模式図
(Sakuma S et al. : J Control Release
134 : 2-10, 2009 より改変)

図3 大腸内視鏡検査用造影剤を用いた大腸がん診断のイメージ

図5 レクチン固定化蛍光ナノスフェア(大腸内視鏡検査用造影剤)の合成方法
(Hiwatari K et al. : Eur J Pharm Bioharm 70 : 453-461, 2008 および Sakuma S et al. : Eur J Pharm
Bioharm 74 : 451-460, 2010 より改変)

Institute of Health の研究グループは、細胞のリソソーム内の弱酸性下で蛍光を発する蛍光プローブを結合させた抗体を用いて、がん細胞に取り込まれたプローブのみが発光するシステムを開発した。同グループは、ヒト乳がん由来細胞を移植した動物モデルを用いて、正常組織に分布した蛍光プローブによるバックグラウンドの影響を軽減した高感度・高選択的な蛍光イメージングの可能性を示すことに成功している¹⁵⁾。

大腸内視鏡検査用造影剤(レクチン固定化蛍光ナノスフェア)の設計コンセプト

筆者らは、大腸がんの発生機序に着目し、「がん細胞の粘膜側表面に発現する特異抗原等を認識する機能および正常な大腸粘膜との間の非特異的な相互作用を抑制する機能を併せ持つ高分子ナノスフェアに、蛍光を発する化合物を内包させ(=造影剤)、その造影剤をがん細胞にアクティブターゲティングし、内視鏡下、正常細胞とがん細胞との間の蛍光コントラストを利用して微小な大腸がんを検出する」、というドラッグデリバリーシステムの概念に基づく研究ストラテジーを考案した⁹⁾。

初期の大腸がんの粘膜側に起こる変化は、大腸全面積からみればわずかな領域の変化である。このわずかな病変を的確に捉えるためには、標的組織であるがん細胞に対する高選択的な認識能に加え、ほかの大部分の正常組織表面を覆っている非標的組織である大腸粘膜に対する非特異的な相互作用の最大限の抑制という観点から、造影剤は設計されなければならない。設計した造影剤を模式的に図2に示す。

造影剤は、大腸がん発生初期に大腸粘膜表面に特異的に発現する Thomsen-Friedenreich (TF) 抗原の末端糖鎖 β -D-galactosyl-(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine (Gal- β (1-3)GalNAc) を認識するピーナッツレクチン (PNA)^{16,17)}、および正常粘膜部位との非特異的な相互作用を抑制するポリ N-ビニルアセトアミド (PNVA) を表面に固定化し¹⁸⁾、蛍光量子効率の高いクマリン 6 を内包したサブミクロンサイズの蛍光性のポリスチレンナノスフェアからなるナノメディシンである。内視鏡下、大腸粘膜上のがん病

変に集積した造影剤の蛍光に由来するがん組織(明部)/正常組織(暗部)のコントラストに基づきがんを診断する(図3)。

筆者らが開発を目指す造影剤は、血管側からがんを検出するのではなく、消化管側から早期の大腸がんを検出するものであり、血管内投与するほかの造影剤とは視点が異なる。造影剤は高分子量のポリスチレンナノスフェアをプラットフォームとして設計されていることから、大腸内投与後に全身循環血へ移行せず、すぐれた安全性が期待される。がんの早期診断は、大部分の健常人のなかから自覚症状のまったくない少数の患者を見つけ出すことであり、診断手法の安全性はきわめて重要である。また、本造影剤は、がんの発生部位の粘膜側からがんを認識するため、血管形成が未熟な超早期段階のがんの検出に適している可能性がある。大腸がん発生初期に大腸粘膜表面に高確率で発現し、がんの悪性度の指標となる TF 抗原の末端糖鎖に対するレクチンの糖鎖認識能を利用して、がん細胞に対する造影剤の親和性(ターゲティング能)を確保するとともに、ポリ N-ビニルアセトアミドの正常粘膜に対する非特異的な相互作用の抑制能を利用して、非標的組織である大腸の正常粘膜に対する造影剤の親和性を低下させ、標的組織であるがん細胞への選択性を相対的に高めることにより、造影剤を用いたがん診断の画像化手法が抱える問題点の解決を試みている。

レクチン固定化蛍光ナノスフェアの合成

造影剤であるレクチン固定化蛍光ナノスフェアの合成方法は2段階にわけられる。

第1段階は、直径が 10^2 nm オーダーで、ポリスチレン核をポリ N-ビニルアセトアミド (PNVA) およびポリメタクリル酸 (PMAA) が被覆し、クマリン 6 を内包した、ピーナッツレクチン (PNA) を固定化するプラットフォームとしての蛍光ナノスフェアの合成である⁹⁾。分子量が 10^3 - 10^4 のオーダーの PNVA および PMAA マクロモノマー(重合性官能基を末端に導入した高分子)とスチレンとをラジカル共重合する(図4)。得られたグラフトコポリマーは、PNVA、PMAA およびポリスチレンの重合時

図4 蛍光ナノスフェア(造影剤のプラットフォーム)の合成方法

(Hiwatari K et al. : Eur J Pharm Biopharm 70 : 453-461, 2008 および Sakuma S et al. : Eur J Pharm Biopharm 74 : 451-460, 2010 より改変)

の溶媒に対する溶解性の違いから、疎水性のポリスチレン相を核とし、その表面に親水性のPNVAおよびPMAAが集積したナノスフェアを形成する。疎水性のカマリン6は(研究当初はFITCコレステロールを用いていたが、現在はカマリン6に変更)、重合時に溶媒中に溶解させるだけで、疎水的相互作用に基づき、ナノスフェアのポリスチレン核に強固に内包される。

引きつづき、第2段階において、蛍光ナノスフェア表面のPMAAのカルボキシル基との間の酸アミド結合を介してPNAを固定化させることにより(図5)、レクチン固定化蛍光ナノスフェアを得ることができる。

レクチン固定化蛍光ナノスフェア表面の化学構造の最適化

レクチンは、細胞表面に発現している特定の糖鎖に特異的かつ可逆的に結合する蛋白質である¹⁹⁾。その活性を測定する代表的な方法として、赤血球凝集試験が知られている。

レクチンは分子内に糖鎖を認識する数個の結合部位を持つことから、赤血球表面の糖鎖とレクチンとの結合を介して赤血球の架橋構造が形成され、赤血球は凝集する。赤血球凝集に必要なレクチンの最低濃度(本研究ではminimum agglutination concentration : MACと定義)が低いほど、標的糖鎖に対するレクチンの親和性は高い。PNAが認識するGal-β(1-3)GalNAcはNeuraminidase処理した赤血球表面に発現していることから、同赤血球に対するレクチン固定化蛍光ナノスフェアのMAC(PNA

濃度に換算)を指標として、ナノスフェアの同糖鎖に対する親和性を見積もることができる。さらに、大量のレクチンはNeuraminidase未処理の赤血球を非特異的に凝集させることから、同酵素未処理の赤血球に対するナノスフェアのMACを求め、前述の酵素処理した赤血球に対するナノスフェアのMACとの比を算出することにより、ナノスフェアのGal- β (1-3)GalNAcに対する特異性を見積もることができる。このMAC比(酵素未処理/酵素処理)が大きいほど特異性は高い。

インタクトのPNAの場合、Neuraminidase処理した赤血球に対するMACは約0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MAC比は約10~20であった⁹⁾。筆者らは、レクチン固定化蛍光ナノスフェアの化学構造の変動因子として、PNVAの分子量、PMAAの分子量、PNVAとPMAAの導入比率、PNA固定化量の4点に着目した。化学構造の異なるレクチン固定化ナノスフェアの*in vitro*活性を検討した結果、PNVAとPMAAの分子量の組合せがナノスフェア表面に固定化されたPNAの活性に最も影響を及ぼすことが明らかとなった。プラットフォームである蛍光ナノスフェア表面のPNVAとPMAAの分子量をほぼ等しくすることにより、インタクトのPNAと同等のGal- β (1-3)GalNAcに対する親和性を示し、かつ、インタクトのPNAよりすぐれた同糖鎖に対する特異性を示すレクチン固定化蛍光ナノスフェアの獲得に成功した(Neuraminidase処理した赤血球に対するMAC:1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Neuraminidase未処理の赤血球に対するMAC:125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^{9,10)}。

***In vitro* 試験によるレクチン固定化蛍光ナノスフェアのがん細胞認識能の評価**

細胞表面には、糖蛋白や糖脂質、多糖という形態で糖質が存在し、レクチンや抗体などのリガンドは、これらの糖質と相互作用することが知られている²⁰⁾。リガンドとしてPNAを用いたレクチン固定化蛍光ナノスフェアは、大腸がん細胞の粘膜側表面に発現するTF抗原の末端糖鎖Gal- β (1-3)GalNAcを特異的に認識することが期待される。そこで、HT-29, HCT-116, LS174T等のヒト大腸がん由来

細胞、TF抗原フリーの正常ヒト小腸上皮細胞を用いて、ナノスフェアのがん細胞認識能を評価した。

ナノスフェアとインキュベートしたのちの細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、大腸がん細胞に付着した造影剤に由来する強い蛍光が観察された(図6)。いずれの大腸がん細胞においても、その蛍光強度は小腸上皮細胞よりも強く、TF抗原の有無が付着性の違いに影響していると考えられた。また、がん細胞間で蛍光強度は異なっており、その序列は各細胞のTF抗原の発現レベルに関連していると考えられた。

以上の結果から、がんおよび正常組織に対するナノスフェアの認識能の違いを利用して、両組織間の蛍光コントラストが得られる可能性が示された¹⁰⁾。

***In vivo* 試験によるレクチン固定化蛍光ナノスフェアの腫瘍組織認識能の評価**

抗がん剤の抗腫瘍効果を検討する場合、採取された臓器に関係なく、ヒト由来のがん細胞を免疫不全マウス(ヌードマウスなど)の背部皮下に移植する異所移植モデルが繁用される。一方、ヒトの各臓器に由来するがん細胞を免疫不全マウスの対応する臓器に移植するモデルを同所移植モデルという。大腸がんの同所移植モデルの作成方法として、①ヒト大腸がん由来細胞を免疫不全マウスの大腸漿膜下に直接移植する方法²¹⁾、②ヒト大腸がん由来細胞を免疫不全マウスの背部皮下に移植し、成長した腫瘍組織を採取後、別の免疫不全マウスの大腸漿膜下に腫瘍組織を移植する方法²²⁾、の2通りが報告されている。筆者らは、いずれの方法であっても、がん細胞あるいは腫瘍組織移植後一定期間飼育したマウスの大腸粘膜側にがんが浸潤することを見だし、HT-29, HCT-116あるいはLS174T由来の腫瘍が免疫不全マウスの大腸粘膜上に発現した同所移植モデルを開発した^{10,11)}。

同*in vivo*モデルを用いて、レクチン固定化蛍光ナノスフェアの腫瘍組織認識能を評価した。腫瘍部位を含む大腸のループを作製し、ループ内にナノスフェアを注入し、一定時間インキュベートしたのち、大腸内を洗浄し、大腸の粘膜表面を蛍光顕微鏡

図6 レクチン固定化蛍光ナノスフェアとインキュベートした後のヒト大腸がん由来細胞 HT-29 の蛍光顕微鏡写真 (倍率: 400 倍, 励起波長: 470~495 nm, 蛍光波長: 510~550 nm, 露光時間: 1/60 秒)

図7 *In vivo* 同所移植ヌードマウス (a) および正常ヌードマウス (b) の大腸粘膜を造影剤と接触させた後の蛍光顕微鏡写真 (倍率: 40 倍, 励起波長: 470~495 nm, 蛍光波長: 510~550 nm, 露光時間: 1/60 秒)

(Sakuma S et al.: J Control Release 134: 2-10, 2009 より改変)

で観察した。その結果、ナノスフェアとインキュベートした後の大腸粘膜上の特定個所に、造影剤に由来する強い蛍光が観察された(図 7a)。移植するがん細胞を変更しても、同様の結果が得られた。

一方、がんを移植していない正常マウスを用いた場合、ナノスフェアの粘膜への付着・集積はほとんど認められなかった(図 7b)。さらに、腫瘍部位を含む大腸の病理所見を行った結果、レクチン固定化蛍光ナノスフェアは大腸粘膜上のがんを確実に認識し、かつ、ナノスフェアに由来する蛍光が観察されない大腸粘膜上にがんは存在しないことが明らかとなった。

以上の結果から、レクチン固定化蛍光ナノスフェアは、*in vivo* において、正常組織との非特異的な相互作用を最大限に抑制しながら、大腸粘膜上の数 mm サイズのがんを高感度・高選択的に認識していることが証明された^{10,11)}。

おわりに

新規抗がん剤の開発とともに、がんの超早期診断法を確立することは、その治療成績の向上を実現するうえできわめて重要である。筆者らは、すぐれた国際競争力を持つ内視鏡を用いた大腸がんの診断・治療に世界初の大腸内視鏡検査用造影剤(レクチン固定化蛍光ナノスフェア)を一体化し、大腸がんの超早期・高精度診断システムを確立することを目指している。ここに示した成果を受けて、現在、有効性および安全性の観点から、本造影剤が医薬品のシーズとなる可能性の有無を明らかにすることを目的とした研究を進めている。ヒトにおける大腸がんの発症を擬似した遺伝子改変マウス等を用いた試験を通して、造影剤の有効性を多面的に評価するとともに、これまで未検討であった造影剤の安全性に関する検討も開始している。また、造影剤のデリバリールートに関する知見を得るため、造影剤の経口投与あるいは注腸投与後の体内動態も検討する予定である。

本内視鏡診断・治療システムの確立を通して、転移リスクのない段階で大腸がんを切除することが可能となり、“治らない病気”から“治る病気”へ、

大腸がんの治療が大きく変わることを期待したい。

文 献

- 1) Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J et al : Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 56(2) : 106-130, 2006.
- 2) <http://www.cancer.gov>
- 3) 石黒 敦, 設楽紘平, 棟方正樹, 斎藤 聡, 坂田 優 : 大腸癌化学療法最近の進歩. *Jpn J Cancer Chemother* 32(13) : 2017-2023, 2005.
- 4) Pessino A, Sobrero A : Optimal treatment of metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 6(5) : 801-812, 2006.
- 5) Harford WV : Colorectal cancer screening and surveillance. *Surg Oncol Clin N Am* 15(1) : 1-20, 2006.
- 6) Balch GC, De Meo A, Guillem JG : Modern management of rectal cancer : a 2006 update. *World J Gastroenterol* 12(20) : 3186-3195, 2006.
- 7) Ponchon T : Endoscopic mucosal resection. *J Clin Gastroenterol* 32(1) : 6-10, 2001.
- 8) Kashida H, Kudo S : Early colorectal cancer : concept, diagnosis, and management. *Inter J Clin Onco* 11(1) : 1-8, 2006.
- 9) Hiwatari K, Sakuma S, Iwata K, Masaoka Y, Kataoka M et al : Poly(N-vinylacetamide) chains enhance lectin-induced biorecognition through the reduction of nonspecific interactions with non-targets. *Eur J Pharm Biopharm* 70(2) : 453-461, 2008.
- 10) Sakuma S, Yano T, Masaoka Y, Kataoka M, Hiwatari K et al : In vitro/in vivo biorecognition of lectin-immobilized fluorescent nanospheres for human colorectal cancer cells. *J Control Release* 134(1) : 2-10, 2009.
- 11) Sakuma S, Yano T, Masaoka Y, Kataoka M, Hiwatari K et al : Detection of early colorectal cancer imaged with peanut agglutinin-immobilized fluorescent nanospheres having surface poly(N-vinylacetamide) chains. *Eur J Pharm Biopharm* 74(3) : 451-460, 2010.
- 12) DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE : Fluorescence and spectral imaging. *Scientific World Journal* 7 : 2046-2071, 2007.
- 13) Tischendorf JJ, Wasmuth HE, Koch A, Hecker H, Trautwein C et al : Value of magnifying chromoendoscopy and narrow band imaging(NBI) in classifying colorectal polyps : a prospective controlled study. *Endoscopy* 39(12) : 1092-1096, 2007.
- 14) Kelly K, Alencar H, Funovics M, Mahmood U, Weissleder R : Detection of invasive colon cancer using a novel, targeted, library-derived fluorescent peptide. *Cancer Res* 64(17) : 6247-6251, 2004.
- 15) Urano Y, Asanuma D, Hama Y, Koyama Y, Barrett T et al : Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat Med* 15 : 104-109, 2009.
- 16) Dabelsteen E : Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J Pathol* 179(4) : 358-369, 1996.
- 17) Sakuma S, Lu Z-R, Kopečková P, Kopeček J : Biorecognizable HPMA copolymer-drug conjugates for colon-specific delivery of 9-aminocamptothecin. *J Control Release* 75(3) : 365-379, 2001.
- 18) Sakuma S, Hayashi M, Akashi M : Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 47(1) : 21-37, 2001.
- 19) Bies C, Lehr CM, Woodley JF : Lectin-mediated drug targeting : history and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 56(4) : 425-435, 2004.
- 20) Corfield AP, Warren BF : Mucus glycoproteins and their role in colorectal disease. *J Pathol* 180(1) : 8-17, 1996.
- 21) Zama M, VandeVen M, Farao M, Gratton E, Ghiglieri A et al : Camptothecin poly [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] copolymers in antitopoisomerase-I tumor therapy : intratumor release and antitumor efficacy. *Mol Cancer Ther* 2(1) : 29-40, 2003.
- 22) <http://www.anticancer.com/>