イムノリポソームによる DDS

特集 リポソームと DDS

鈴木 亮・滝澤知子・丸山一雄*

Immunoliposomes as drug delivery carrier

Polyethylene glycol derivatives containing liposomes (PEG-liposome) are expected to be useful drug delivery tools. Because they are not readily taken up by the reticulo-endothelial system (RES), stay in the circulation for a relatively long period of time and hence can effectively deliver anti-tumor drugs to the sites where have a high permeability of blood vessels such as tumor tissue.

In the future, to improve safety and efficiency of liposome carrier, it is necessary for them to have a property of active targeting. From this point of view, the liposome, which was modified its surface with antibody for target molecule, was developed and it's called "immunoliposome". It is an ideal drug carrier which has both properties of escaping RES and active targeting.

Lately, the liposomes modified with proteins or peptides which recognize specific molecule as well as antibody were developed. In this review, we summarize about the liposomes as an active targeting carrier for tumor therapy.

近年、抗がん剤の薬物送達キャリアとして PEG-リポソームが注目されている。この PEG-リポソームは血中滞留性にすぐれ、腫瘍部位へのパッシブターゲティングが可能であるため、抗がん剤の副作用軽減ならびに抗腫瘍効果増強が期待されている。将来的に、このリポソーム製剤をさまざまな疾病治療に応用していくためには、目的部位にアクティブターゲティング可能な性質をも付与する必要があると考えられる。この観点から、PEG-リポソーム表面を抗体で修飾したイムノリポソームが開発された。このイムノリポソームは、細網内皮系回避能およびアクティブターゲティング能の両者を備えた理想的な薬物送達キャリアである。また、最近では、抗体修飾のみならず特定分子を認識する蛋白やペプチドを修飾したリポソームによるアクティブターゲティングも検討されている。そこで本稿では、がん治療を念頭に、アクティブターゲティング可能なリポソーム製剤について概説する。

Ryo Suzuki・Tomoko Takizawa・Kazuo Maruyama*

key words : liposome, targeting, antibody, drug delivery carrier, anti-tumor drug

脂質二分子膜からなるリポソームは、1965 年に Bangham によって発見されて以来、膜モデルや DDS キャリアとして幅広い分野で注目されてきた。このリポソームは、生体の構成成分であるリン脂質を主成分としているため、毒性や抗原性が低いことが知られている。また、構成脂質を任意にコントロールすることで、膜の電荷・温度感受性・pH 感受性・融合能などの機能を容易に付与可能である。

しかし一方で、生体内での不安定性や静脈内投与後の肝臓や脾臓などの細網内皮系 (RES) への取り込みが問題となり、実用化の課題とされている。この課題を解決する手段として、リポソーム表面を polyethylene glycol (PEG) で修飾したリポソーム

(PEG-リポソーム)が開発され、RES 回避可能な画期的なリポソームとして脚光を浴びている。

この PEG-リポソームは、リポソーム膜表面の PEG により形成される水和層およびその立体障害により補体系蛋白の吸着が抑えられ、単核食細胞系に認識されにくく、血中での安定性、滞留性にすぐれている。一方、がん組織では一般に血管透過性が充進しているため、PEG-リポソームはがん組織に集積する。この現象は enhanced permeability and retention (EPR) 効果¹⁾によるもので、PEG-リポソームのパッシブターゲティングとして知られている。

現在、この EPR 効果を期待した抗がん剤のリポソーム製剤開発が数多く行われている。これまでにドキソルビシンやダウノルビシンを封入した PEG-

* Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University 帝京大学薬学部生物薬剤学教室

図 1 Three types of antibody conjugated liposome

リポソーム製剤(Doxil/Daunosome)が開発され、欧米において実際に臨床で用いられている。

このように抗がん剤のリポソーム製剤は、副作用を軽減し、腫瘍細胞に対する抗がん作用のみを増強しうる有望な治療戦略とされている。この治療効果をさらに向上させるためには、上述のパッシブターゲティングに加え、さらなる機能性を付与したリポソーム製剤戦略が必要となる。そこで考案されたのが、リポソーム表面に抗体を結合させたイムノリポソームである。このイムノリポソームは、リポソーム表面の抗体による標的指向性を有するアクティブターゲティング可能な薬物キャリアとして期待されている。

そこで本稿では、筆者らの研究室で行っている腫瘍細胞をターゲットとしたイムノリポソームの開発について紹介するとともに、がん治療を目的としたイムノリポソームの開発に焦点をあて、最近の動向および今後の展望について論ずる。

イムノリポソーム

イムノリポソームによる腫瘍細胞への薬物送達を考えた場合、まず、静脈内投与されたイムノリポソームが細網内皮系(RES)組織を回避し血中滞留性を有することが重要である。イムノリポソームが、がん細胞表面の抗原を認識するには、まず、腫瘍組織中へ移行しなければならない。

がん組織は、一般に血管透過性が亢進しているため、血中滞留性を有する PEG-リポソームは EPR 効果によって腫瘍組織へパッシブターゲティングされる。その後、腫瘍組織へ移行したリポソームは腫瘍細胞表面の抗原を認識することが可能となる。それゆえ、通常のリポソームに抗体のみを修飾した

けでは、細網内皮系回避や EPR 効果によるパッシブターゲティングが不十分であるため、同時にリポソーム表面への PEG 修飾が必要となる(図 1)。

ここで PEG-リポソームに抗体を修飾する場合、抗体の修飾部位としてリポソームを構成する脂質のヘッドグループに修飾する方法(図 1 ab)と PEG 鎖の末端に修飾する方法(図 1 c)の 2 種類が考えられる。そこで、これら抗体結合部位の異なるイムノリポソームの標的組織集積性について比較検討を行ったところ、前者のリポソーム表面に結合したイムノリポソームでは、PEG の立体障害により抗体の抗原認識能の低下が認められた²⁾。したがって抗体の修飾部位は、抗原認識能が損なわれない PEG 鎖の末端が適当であると考えられ、ペンダント型イムノリポソームともよばれている(図 1 c)。

ペンダント型イムノリポソームは PEG により血中滞留性および抗原認識能を有しており、アクティブターゲティングキャリアとして有望である。しかし、生体内においてマクロファージには Fc レセプターが存在するため、抗体として IgG を用いた場合、その Fc 部分がマクロファージに認識され、抗体修飾量の増加とともに肝臓への取り込みが増加してしまう³⁾。これは、特に腫瘍細胞へのターゲティングにおいては解決すべき問題である。

そこで、この問題を解決するため、抗体の Fc 部分を除去した Fab' フラグメントを用いたイムノリポソーム(Fab'-PEG-リポソーム)が調製された。この Fab'-PEG-リポソームを静脈内投与したあとの血中滞留性について、IgG-PEG-リポソームと比較検討した結果、リポソーム表面の Fab' 分子数が IgG より約 10 倍も高いにもかかわらず、Fab'-PEG-リポソームの血中半減期は IgG-PEG-リポソームより約 6 倍長いことが示された⁴⁾。IgG-PEG-リポソームの消失パターンは、単核球ファゴサイトーシスシステムによる速やかな初期消失と緩やかな後期消失の 2 相性であった。さらに、Fab'-PEG-リポソームの消失は PEG リポソームと同等の消失パターンを示した^{5,6)}。

このことより、IgG 修飾リポソームと異なり Fab' 修飾リポソームが、単核球ファゴサイトーシスシステムによる取り込みから回避できることが判明し

表 1 Tumor-associated antigen on cell surface

	腫瘍関連抗原	腫 瘍
特異的 発現 タイプ	MUC 1	乳房, 肺, 卵巣, 前立腺
	MUC 2, MUC 3	小腸
	TAG-72	大腸, 乳房, 卵巣
	GM 3	メラノーマ
	Lewis X (LeX)	消化器
過剰 発現 タイプ	トランスフェリンレセプター	大腸, メラノーマ, 消化器
	葉酸レセプター	大腸, 肺, 前立腺, 卵巣
	CD 10	白血病, リンフォーマ, ミエローマ, メラノーマ
	CD 19	Ph ⁺ ALL, B細胞リンフォーマ, ミエローマ
	CD 20	悪性 B 細胞
	CEA	大腸

Ph⁺ALL: Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia

CEA: carcinoembryonic antigen

た。それゆえ、イムノリポソームによるアクティブターゲティングにおいて、Fab'フラグメント修飾が最適であると考えられる。

抗体の選択と入手

イムノリポソームを利用したがん治療を行うためには、リポソーム表面に修飾する腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体を入手することが重要である。しかし、通常の方法により作製するモノクローナル抗体はマウス抗体であるため、臨床応用する場合その抗原性が問題となる。

そこで、この問題を解決するために開発されたのが、マウス可変領域とヒト定常領域からなるキメラ抗体やヒト定常領域と大部分の可変領域がヒト型置換されたヒト化抗体である。現在、約 200 種のモノクローナル抗体が移植臓器の拒絶、がん、リウマチやクローン病の治療における臨床試験で用いられている。ここで使用されている大半の抗体は、上述のキメラ抗体⁷⁾やヒト化抗体⁸⁾である。これらの抗体は、抗原性が低く、反復投与可能な抗体として期待されている。

さらに最近では、完全ヒト抗体が作製できるようになり、抗体医薬に新たな風を吹き込みつつある。この完全ヒト抗体は、ヒト抗体の定常領域と可変領域の遺伝子座を持つトランスジェニックマウスを用い、標準的なハイブリドーマ技術により得ることが出来る⁹⁾。そしてこの完全ヒト抗体は抗原性フリー

であり、抗体医薬として、また同様にイムノリポソームの開発においても例外なく使用が望まれるものである。

モノクローナル抗体の作製には、多大なる時間と労力がかかることは周知の事実であるが、近年、この問題を解決しうるモノクローナル抗体作製技術があいついで報告されている。

Pasqualini らは、温度感受性 SV40 トランスジェニックマウスの B 細胞が条件的不死化細胞であることに着目し、モノクローナル抗体産生細胞として利用した¹⁰⁾。また、Traggiai らは、ヒトメモリー B 細胞を Epstein-Barr virus により形質転換する方法を提示した¹¹⁾。いずれの方法も、B 細胞とミエローマ細胞を融合するハイブリドーマ作製ステップを排除する方法であり、モノクローナル抗体作製における画期的なスピードアップ法として期待される。

また、ファージディスプレイ技術により、single chain Fv(scFv)などの抗体フラグメントや完全抗体の作製が可能となり、この方法を用いたヒトイムノグロブリン可変領域(抗原認識部位)の網羅的スクリーニング方法も報告されている^{12,13)}。この技術を用いれば、原理的に抗体ライブラリーのレパートリーに限界がなく、任意の抗原に対する親和性の高い抗体を短期間のうちに作製し、使用することが可能になると期待される。

このように、目的とする抗体や抗体フラグメントを作製する技術が整いつつあり、これらの技術が抗体医薬ならびにイムノリポソームの開発に大きく貢

図 2 Intracellular uptake of CD19-liposomes in Ph⁺ALL cell lines

Ph⁺ALL cell lines were incubated with calcein-bare-, calcein-PEG- or calcein-CD 19-liposomes at 37°C for 60 min and treated with pronase. The rate of calcein-positive cells was determined by flowcytometry.

献するものと考えられる。

腫瘍関連抗原(ターゲット分子)

正常細胞から腫瘍細胞への形質転換においては、さまざまな遺伝子の変異、過剰発現や発現低下といった複雑な遺伝子レベルでの発現調節が起きている。

近年、腫瘍発生学や分子生物学の目覚ましい発展に伴い、遺伝子レベルのみならず蛋白質レベルでの発現調節が解明されつつあり、さまざまな腫瘍関連抗原が同定されつつある。そのなかで、がん化により細胞表面上に発現するものは、腫瘍細胞に特異的に発現する抗原と腫瘍細胞に過剰に発現する抗原の2種類に大別される(表1)。前者の腫瘍細胞に特異的に発現する抗原として、乳がんや卵巣がん、肺がん、前立腺がんのムチン MUC1¹⁴⁾、MUC2、MUC3¹⁵⁾、悪性上皮性がんのムチン様腫瘍関連糖蛋白質 TAG-72¹⁶⁾、メラノーマ細胞のガングリオシド GM3¹⁷⁾、消化器がんの Lewis X¹⁸⁾などが報告されている。

一方、後者の腫瘍細胞に過剰発現する抗原としては、トランスフェリンレセプター¹⁹⁾、葉酸レセプター²⁰⁾、CD19²¹⁾、CD20²²⁾、CEA(carcinoembryonic antigen)²³⁾などが報告されている。

これら腫瘍細胞表面に特異的もしくは過剰に発現

する腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞へのアクティブターゲティングのための最適なターゲット分子となりうる。それゆえ、これら腫瘍関連抗原に対する抗体やリガンドを作製して PEG-リポソームに修飾することにより、アクティブターゲティングによる腫瘍細胞への特異的薬物送達が可能になると考えられる。

実際に Nam らは、Lewis X やガングリオシド GM3 に対する抗体を用いて、イムノリポソームによる腫瘍へのターゲティングについて検討を行っている¹⁸⁾。筆者らもまた、がん治療に向けてトランスフェリン修飾リポソーム^{2,24~27)}や抗 CD19 抗体を修飾したリポソーム²¹⁾を用いて検討を行っており、これについては後に述べる。

またさらには、ファージディスプレイ技術により新規リガンドを探索し、これを用いた腫瘍組織へのターゲティング方法が検討されている。奥らは、腫瘍血管内皮細胞に特異的に発現する分子に対し親和性を有するペプチドをスクリーニングし、そのペプチドをリポソーム表面に修飾することで腫瘍ターゲティング可能なりポソーム製剤開発を試みている²⁸⁾。

抗 CD19 抗体結合 PEG-リポソームによる検討²¹⁾

チロシンキナーゼインヒビターであるメシル酸イマチニブ(STI571)は、近年 Philadelphia chromo-

図 3 Apoptosis induction by STI571-encapsulated liposomes

KOPN-72 cells were treated with the indicated STI 571-encapsulated liposomes at various concentrations of STI571 and cultured for 48 hours. The rate of annexin V-positive cells was determined by flow-cytometry.

some-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph⁺ ALL) に対して使用が認められたが、多くの場合速やかに耐性を生じる。この対策として、高用量投与は細胞内濃度を上昇させることが可能であるが、他の細胞に対する毒性のために、使用は制限される。ほとんどすべての Ph⁺ALL は、誘導の過程において細胞表面に CD19 を過剰発現している。そのため、Ph⁺ALL への高濃度薬物ターゲティングを目的とし、STI571 内封 PEG-リポソームに抗 CD19 抗体を結合させ、抗 CD19 抗体結合 PEG-リポソーム (STI571-CD19-liposome) による新規細胞標的療法について検討を行った。

リポソームは STI571 溶液を用いて調製し、STI 571 内封リポソームを調製したあと、SPDP 法により抗体を PEG 末端に結合させた。調製したリポソームについて、種々の白血病細胞に対する細胞内取り込みおよび細胞毒性を *in vitro* において検討した。また、それにより誘導される細胞のアポトーシスを annexin-V アッセイにより調べた。その結果、STI571-CD19-リポソームは Ph⁺ALL 特異的に細胞に結合して内在化され、STI571 単独にくらべて高い細胞毒性を示した (図 2)。同様に annexin-V

図 4 Time course of tumor accumulation of I-OHP in colon26 bearing mice

Colon26 cells (2×10^6 cells) were subcutaneously implanted to BALB/c mice. When the tumor volume was reached to 150 mm³, these mice were intravenously injected I-OHP solution, I-OHP-encapsulated Bare-, PEG- or TF-PEG-liposomes (I-OHP : 5 mg/kg weight). After injection, serum was collected at indicated time points and I-OHP concentration in the serum was measured with MIP-MS.

アッセイにおいても、STI571 単独にくらべて高いアポトーシスの誘導が確認された (図 3)。

これらの検討結果より、*in vivo* においても STI 571 単独投与にくらべて高濃度に Ph⁺ALL 特異的な薬物送達が可能と考えられ、これにより他臓器への副作用を抑えた Ph⁺ALL 特異的な殺細胞効果が得られると期待される。そして、さらに現在、Ph⁺ALL 患者からの STI571 耐性初代培養細胞に対し、*in vitro* および動物モデルにおいてターゲティング効果の検討を進めている。

トランスフェリン修飾 PEG-リポソームを用いた検討

トランスフェリン (TF) は鉄結合性の血漿蛋白で、一本鎖ポリペプチドからなる分子量約 80,000 の糖蛋白である。ヒト血液中には通常 246~444 mg/dL 存在し、細胞表面の TF レセプターを介して鉄の供給に寄与している。腫瘍関連抗原の項にも示したとおり、種々の腫瘍細胞において TF レセプターが過剰発現していることが知られている。また、TF の細胞内取り込みにおいてはレセプターのリサイク

図 5 Anti-tumor activity of I-OHP liposome against colon26 bearing mice

Colon26 cells (2×10^6 cells) were subcutaneously implanted to BALB/c mice. As shown schedule, these mice were intravenously injected I-OHP solution, I-OHP-encapsulated Bare-, PEG- or TF-PEG-liposome (I-OHP : 5 mg/kg weight) twice every three days. The tumor size was measured at indicated time points, and the tumor growth ratio was graphed.

ルが行われ、内在化後にライソゾームとの融合が起きないことから、TF を腫瘍組織への標的リガンドとして有用性が高いと考えられる。

オキザリプラチン (I-OHP) は、諸外国において優秀な治療成績をあげている抗がん剤であるが、血中からの消失が非常に速い薬物である。そこで、この薬物の血中滞留性の改善および治療効果の向上を目的とし、I-OHP を TF-PEG リポソームに内封し、担がんマウスモデルにおいて腫瘍組織集積性と抗腫瘍効果について検討した。その結果、I-OHP を PEG-リポソームに内封することで血中滞留時間が延長し、高い腫瘍組織中薬物濃度が得られた。

さらに、TF を結合させることで、より高い腫瘍組織中濃度を示し、かつ長時間にわたり高い腫瘍組織中濃度を維持し、すぐれた腫瘍組織集積性を示した (図 4)。そして、これを反映した高い腫瘍増殖抑制効果が示された (図 5)。また、リポソーム化による毒性の発現が認められなかったことから、投与スケジュールを最適化することにより、さらなる治療効果の向上が期待される。

現在、筆者らは I-OHP 内封 TF-PEG-リポソームの製剤化実現のため、さらなる検討を進めている。

おわりに

PEG-リポソームの有用性が認められているが、その一方で、限界や問題点がしだいに明らかになりつつある。たとえば、Doxil の臨床応用において、皮膚、特に圧迫部位への予期せぬ集積やそれによる毒性発現が報告されている。この現象について、リポソームの脂質組成、サイズ、薬物放出速度との関連性に関して研究が行われているが、未解明な部分が多い^{29,30)}。この Doxil の例からわかるように、PEG-リポソームの体内動態をパッシブターゲティングのみで制御することは困難である。

PEG-リポソームの安全性および有効性を改善し、臨床での有用性をさらに向上させるためには、血中滞留性を維持しつつ、目的部位のみに薬物送達できるアクティブターゲティング能などの新たな機能性を付与することが必要である。この課題を解決する方法として、抗体を結合させたイムノリポソームが開発され、国内においても臨床試験が行われるに至っている。このようなリポソームへの修飾は、抗体のみならずさまざまなリガンドや蛋白分子に応用可能であり、今後のリポソーム製剤開発において必要不可欠なものと考えられる。

このようにリポソーム製剤は、これまでの血中滞留型キャリアから、治療目的に合わせた標的指向性キャリアとして進化しつつあり、今後のさらなる発展が期待される。

文 献

- 1) Matsumura Y, Maeda H : A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46 : 6387-6392, 1986.
- 2) Maruyama K, Ishida O, Takizawa T, Moribe K : Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 40 : 89-102, 1999.
- 3) Aragnol D, Leserman LD : Immune clearance of liposomes inhibited by an anti-Fc receptor antibody *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 2699-2703, 1986.
- 4) Maruyama K, Takahashi N, Tagawa T, Nagaike K, Iwatsuru M : Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors *in vivo*. *FEBS Lett* 413 : 177-180, 1997.
- 5) Allen TM, Sapra P, Moase E, Moreira J, Iden D : Adventures in targeting. *J Liposome Res* 12 : 5-12, 2002.
- 6) Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Sapra P, Moase EH et al. : Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res* 63 : 86-92, 2003.
- 7) Buske C, Feuring-Buske M, Unterhalt M, Hiddemann W : Monoclonal antibody therapy for B cell non-Hodgkin's lymphomas : emerging concepts of a tumour-targeted strategy. *Eur J Cancer* 35 : 549-557, 1999.
- 8) Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G : Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321 : 522-525, 1986.
- 9) Fishwild DM, O'Donnell SL, Bengoechea T, Hudson DV, Harding F et al. : High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol* 14 : 845-851, 1996.
- 10) Pasqualini R, Arap W : Hybridoma-free generation of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 257-259, 2004.
- 11) Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y et al. : An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells : potent neutralization of SARS coronavirus. *Nature Med* 10 : 871-875, 2004.
- 12) Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E et al. : Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library : the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 6157-6162, 1998.
- 13) Marks C, Marks JD : Phage libraries-a new route to clinically useful antibodies. *N Engl J Med* 335 : 730-733, 1996.
- 14) Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, Dalziel M : MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1455 : 301-313, 1999.
- 15) Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL et al. : Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 53 : 641-651, 1993.
- 16) Thor A, Ohuchi N, Szpak CA, Johnston WW, Schlom J : Distribution of oncofetal antigen tumor-associated glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B 72.3. *Cancer Res* 46 : 3118-3124, 1986.
- 17) Hirabayashi Y, Hamaoka A, Matsumoto M, Matsubara T, Tagawa M et al. : Syngeneic monoclonal antibody against melanoma antigen with interspecies cross-reactivity recognizes GM3, a prominent ganglioside of B16 melanoma. *J Biol Chem* 260 : 13328-13333, 1985.
- 18) Nam SM, Kim HS, Ahn WS, Park YS : Sterically stabilized anti-GM 3, anti-Leximmunoliposomes : targeting to B16BL6, HRT-18 cancer cells. *Oncol Res* 11 : 9-16, 1999.
- 19) Keer HN, Kozlowski JM, Tsai YC, Lee C, McEwan RN et al. : Elevated transferrin receptor content in human prostate cancer cell lines assessed *in vitro* and *in vivo*. *J Urol* 143 : 381-385, 1990.
- 20) Coney LR, Tomassetti A, Carayannopoulos L, Frasca V, Kamen BA et al. : Cloning of a tumor-associated antigen : MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein. *Cancer Res* 51 : 6125-6132, 1991.
- 21) Harata M, Soda Y, Tani K, Ooi J, Takizawa T et al. : CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 104 : 1442-1449, 2004.
- 22) Vervoordeldonk SF, Merle PA, van Leeuwen EF, von dem Borne AE, Slaper-Cortenbach IC : Preclinical studies with radiolabeled monoclonal antibodies for treatment of patients with B-cell malignancies. *Cancer* 73 : 1006-1011, 1994.
- 23) Gold P, Goldenberg NA : The carcinoembryonic antigen (CEA) : past, present, and future. *McGill J Med* 3 : 46-66, 1998.
- 24) Yanagie H, Ogura K, Takagi K, Maruyama K, Matsumoto T et al. : Accumulation of boron compounds to tumor with polyethylene-glycol binding liposome by using neutron capture autoradiography. *Appl Radiat Isot* 61 : 639-646, 2004.
- 25) Kakudo T, Chaki S, Futaki S, Nakase I, Akaji K et al. : Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide : an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry* 43 : 5618-5628, 2004.
- 26) Iinuma H, Maruyama K, Okinaga K, Sasaki K, Sekine T et al. : Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer* 99 : 130-137, 2002.
- 27) Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K et al. : Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors *in vivo*. *Pharm Res* 18 : 1042-1048, 2001.
- 28) Oku N, Asai T, Watanabe K, Kuromi K, Nagatsuka M et al. : Anti-neovascular therapy using novel peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* 21 : 2662-2669, 2002.
- 29) Charrois GJ, Allen TM : Rate of biodistribution of STEALTH liposomes to tumor and skin : influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. *Biochim Biophys Acta* 1609 : 102-108, 2003.
- 30) Charrois GJ, Allen TM : Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1663 : 167-177, 2004.