

室温にてその結合を測定した。図5に示したように、フィブリノーゲンの結合は濃度依存性、時間依存性に増加し、リガンド濃度を0としてからは、結合の解離が観察された。

V. SPR法による結合測定— α IIb β 3の固定化

この方法は細胞の影響を全て排除した唯一の測定系であり、測定に影響を与える不確定要素が最も少ない方法であると言える。実験方法は図1Dに示したように、1) センサーチップに抗インテグリン抗体を固定化する。2) α IIb β 3-CHOの細胞溶解液を流して、 α IIb β 3をセンサーチップに捕捉する。3) H12Vを流しチップに捕捉した α IIb β 3との結合を測定する、の3段階で構成される。

まず始めに、抗 α IIb β 3抗体を介して α IIb β 3をセンサーチップCM5に固定化する方法を試みた。この方法の利点は、細胞溶解液から比較的容易に直接 α IIb β 3を捕捉することが可能であること。また、 α IIb β 3がチップ上に補足される向きが一定になるため、適当な抗 α IIb β 3抗体を用いることで、 α IIb β 3のリガンド結合部位の向きを揃えることができる点である。本実験では、 α IIbの脚部(calf-1 domain)に結合し、リガンド結合を阻害しないPL98DF6と、 β 3に結合するVNR5-2を使用した。まず、PL98DF6の固定化を試みた。図6に示したように、PL98DF6を注入してもセンソグラム上SPRシグナルの増加がほとんど見られなかった。続いてVNR5-2の固定化を行った。PL98DF6と異なり、SPRシグナルの増加が観察された(図7)。そこでVNR5-2を固定化したチップを用い、細胞溶解液からの α IIb β 3の捕捉を試みた(図8)。図7と同様に、VNR5-2の固定化は観察されたが、細胞溶解液を注入してもSPRシグナルの増加はほとんど認められなかつ

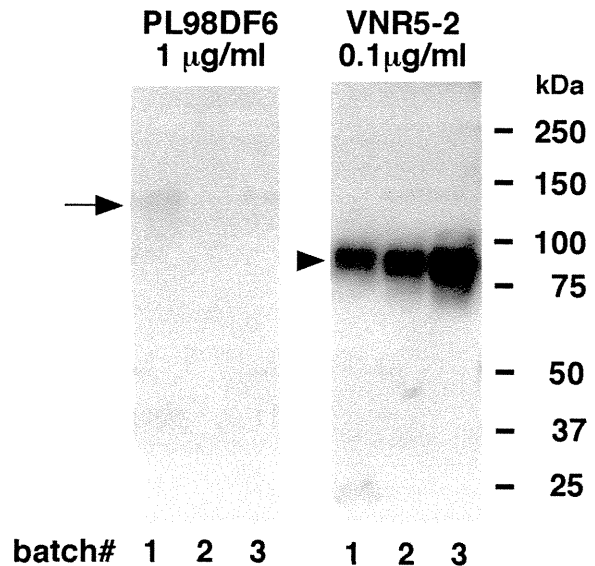


図9. 精製 α IIb β 3のイムノブロット解析

た。原因は、元々 α IIb β 3のソースとして使用したQ595NTTクローン#48の発現量は低く、細胞溶解液中の α IIb β 3濃度が十分ではないことが考えられた。そこでone stepでの補足を諦め、細胞溶解液から α IIb β 3をアフィニティー精製することにした。この目的のため、 α IIb β 3結合配列であるRGDペプチドを担体に固定化したRGDカラムを作成した。細胞溶解液を一旦このRGDカラムに通して溶解液中の α IIb β 3を結合させ、洗浄した後に結合画分を5mM EDTAにて溶出した。図9は、溶出液20 μ lをSDS-PAGEにて泳動し、ウエスタンブロット法で α IIb β 3を検出したものである。抗 β 3モノクローナル抗体であるVNR5-2を用いたところ、回収量が異なるものの、各バッチから β 3に相当する約85kDaのバンドが検出された。一方、同じ検体を抗 α IIbモノクローナル抗体であるPL98DF6を用いて発色させたところ、一部から α IIbに相当する約145kDaのバンドが検出されたものの、その検出量は β 3比べると非常に少なかった。BCA法によるたんぱく質定量では、 α IIb β 3濃度11.41~38.66 μ g/mlであり、チップへの固定化に十分な濃度であ

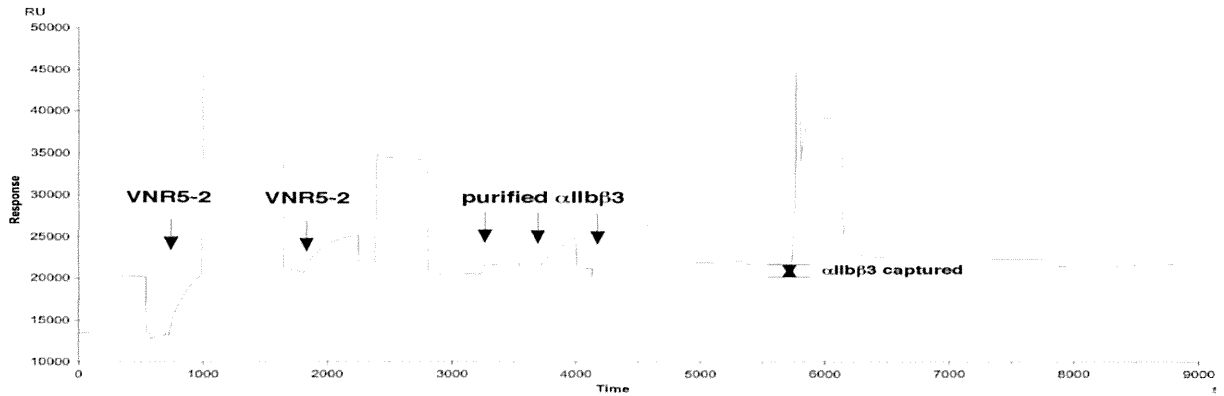


図 1 0. 抗β抗体 VNR5-2 を介した精製αIIbβ3 の捕捉

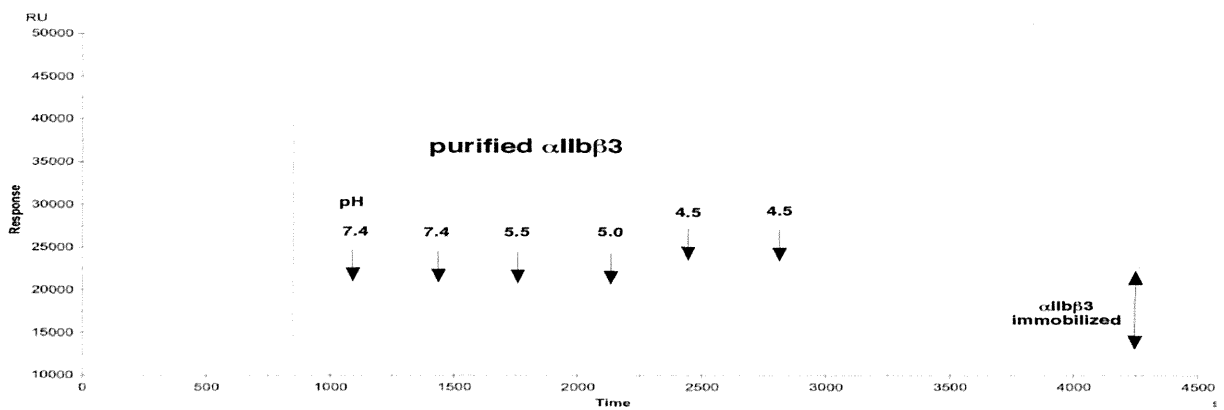


図 1 1. 精製αIIbβ3 の固定化

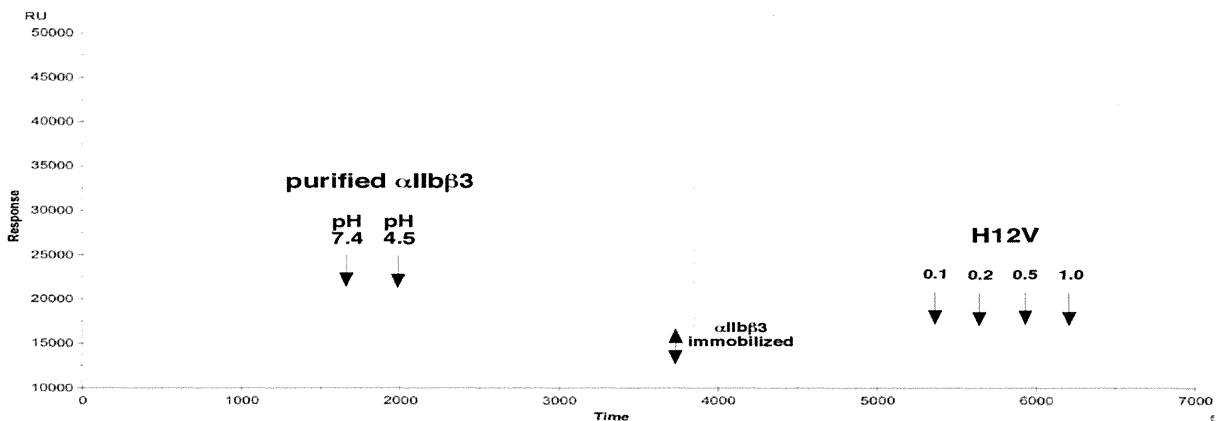


図 1 2. 固定化したαIIbβ3 と H12V の結合

った。次に、VNR5-2 を固定化したチップに精製したαIIbβ3 を流し、チップへの補足を試みた。われわれの予想に反し、精製αIIbβ3 は全く補足されなかった(図 1 0)。そこで抗体を介してチップに補足することを諦め、精製αIIbβ3 を直接 CM5 チップに

固定化することにした。図 1 1 に示したように、精製αIIbβ3 の固定化は pH の影響を大きく受けた。中性条件下ではカップリング率は低く、pH が低くなるにつれてカップリング率が上がり、SPR シグナルが増加した。pH 4.5 で 5000RU 以上のαIIbβ3 が

チップに固定化された。

VI. SPR法による結合測定—固定化 α I**Ib** β 3とH12Vの結合

次に、 α I**Ib** β 3が固定化されたチップに、異なる濃度のH12Vを注入し、結合を観察した。図12に示したように、シグナルの増加は全く観察されなかった。そこで α I**Ib** β 3がチップ上に本当に固定化されているか否かを確認するため、H12Vの代わりに抗 α I**Ib** β 3モノクローナル抗体を注入した。精製 α I**Ib** β 3を固定化したチップにPL98DF6(図13)、VNR5-2(図14)を注入しても、SPRシグナルの増加はほとんど観察されなかった。

VII. 可溶性 α I**Ib** β 3 cDNAの作成

α I**Ib**と β 3はともに細胞膜を一回貫通するI型膜タンパク質である。N末端側に大きな細胞外ドメインをもち、これに一個の膜貫通ドメイン、C末端側の短い細胞内ドメインが続く。このため細胞膜から α I**Ib** β 3を精製するためには、界面活性剤を用いて細胞膜を可溶化しなければならない。このステップを回避するため、可溶性 α I**Ib** β 3を作製した。まず膜貫通ドメイン以降を欠損した変異体のcDNAを作成した。図15に示したように、 α I**Ib**、 β 3膜貫通ドメインのN末端側のアミノ酸残基に部位指定変異法を用いて停止コドン導入した。具体的には、野生型 α I**Ib** cDNAのアミノ酸残基Glu-960(α I**Ib**-960tr)、野生型 β 3 cDNAのアミノ酸残基Pro-691に停止コドン導入した(β 3-691tr)。同様の変異を高活性型 α I**Ib**

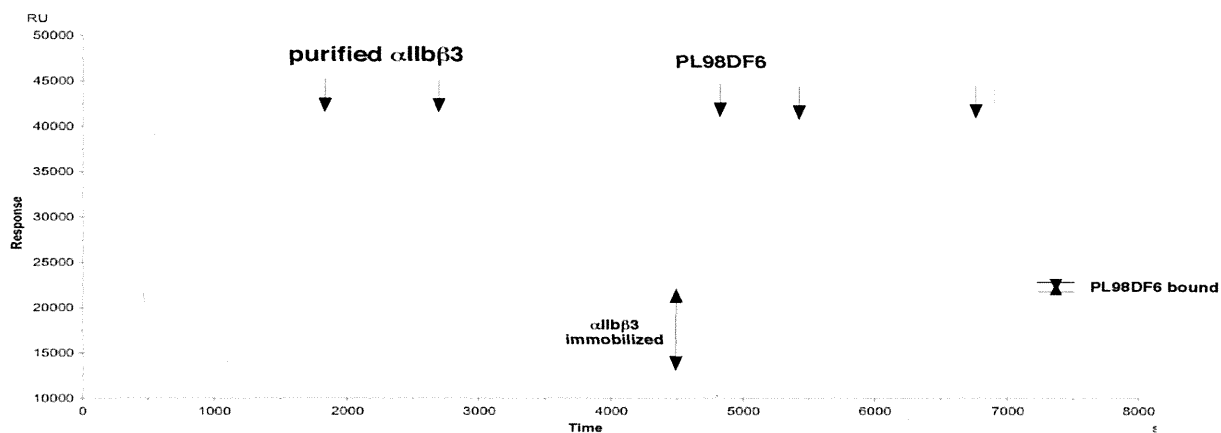


図13. 固定化した α I**Ib** β 3と抗 α I**Ib**抗体PL98DF6の結合

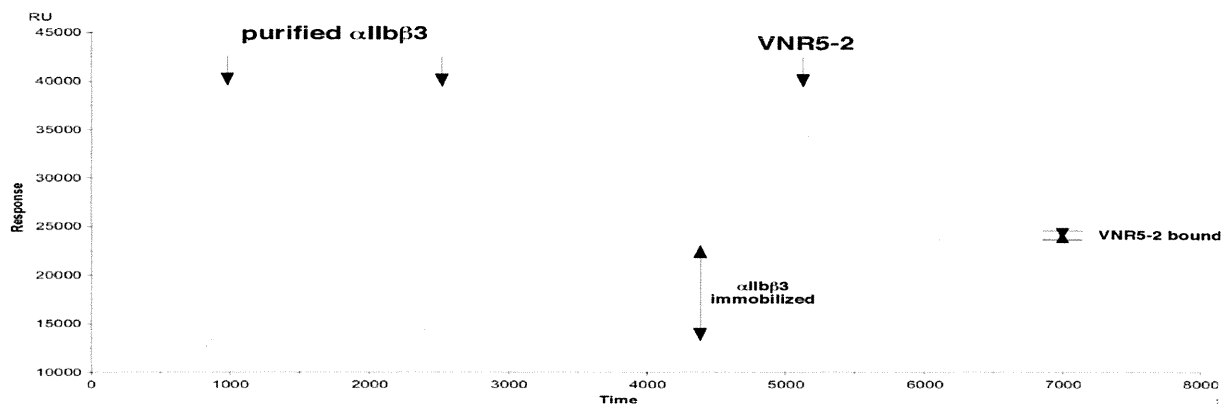


図14. 固定化した α I**Ib** β 3と抗 β 3抗体VNR5-2の結合

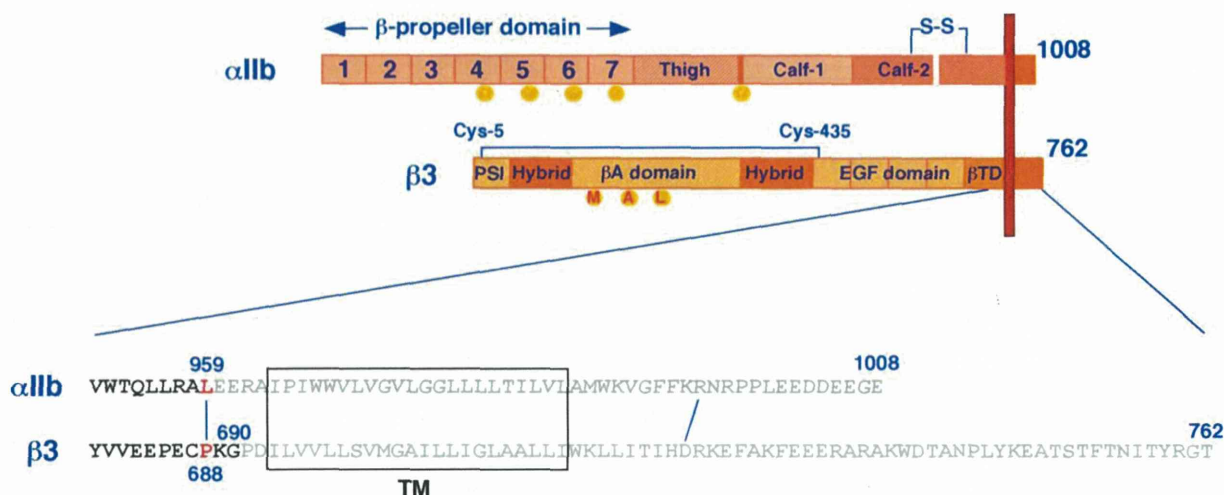


図15. 可溶性 α IIb β 3 の設計

変異体 (Q595NTT) にも導入した (α IIb-595N-960tr)。さらに、これらのアミノ酸残基 Pro-688 をそれぞれ Cys 残基に置換した cDNA を作成した (α IIb-959C-960tr、 α IIb-595N-959C-960tr、 β 3-688C-691tr)。この変異により、 α IIb と β 3 の間にジスルフィド結合が形成される。

VIII. FACS による発現確認

上記の cDNA を CHO 細胞に導入し、発現確認を行った。これらの α IIb β 3 は複数箇所に変異をもつため、発現が障害される可能性が十分に考えられる。膜貫通ドメインをもたない可溶性 α IIb β 3 は細胞膜に留まることができないため、従来の FACS による発現量測定は困難である。そこで、変異 α IIb と野生型 β 3、野生型 α IIb と変異 β 3 をそれぞれ動物細胞に共発現させた。この場合、 α IIb と β 3 のどちらかが膜貫通ドメインをもつため細胞膜に留まり、FACS による細胞表面での発現量測定が可能となる。一次抗体として PL98DF6 (anti- α IIb)、7E3 (anti- β 3)、PT25-2 (anti- α IIb β 3 複合体) を、二次抗体として RPE 標識抗マウス IgG を用い、FACS にて蛍光量を測定した。図16は各発現細胞の蛍光強度をヒ

ストグラムで表したものである。その結果、野生型 α IIb β 3 の発現に比べ、 α IIb/ β 3-691tr の発現は若干減少していた。 α IIb-960tr/ β 3 と α IIb-595N-960tr/ β 3 の発現も有意に低かった。一方、 β 3 鎖の C 末端に Cys 変異を有する α IIb/ β 3-688C-691tr の発現は野生型に比べ大きな差はなかった。しかし、 α IIb 鎖の C 末端に Cys 変異を有する α IIb-959C-960tr/ β 3 の発現は明らかに低く、 α IIb-595N-959C-960tr/ β 3 の発現は野生型に比べ著明に減少していた (図17)。

IX. 可溶性 α IIb β 3 の発現

α IIb と β 3 の双方の膜貫通ドメイン以降を欠損した可溶性 α IIb β 3 を CHO 細胞に発現し、ウエスタンブロット法にて発現量の比較を行った。方法は、 α IIb cDNA と β 3 cDNA を電気穿孔法にて CHO 細胞に導入し、48時間後培養上清を回収した。図18左は培養上清 10 μ l を SDS-PAGE で展開した後 PVDF 膜に転写し、anti- β 3 mAb の VNR5-2 を用いて上清中の β 3 を可視化したものである。SDS-PAGE では α IIb と β 3 は解離して泳動するため、 β 3 は分子量約 85kDa の単一のバンドとして検出された。使用した cDNA クローンによる差はある

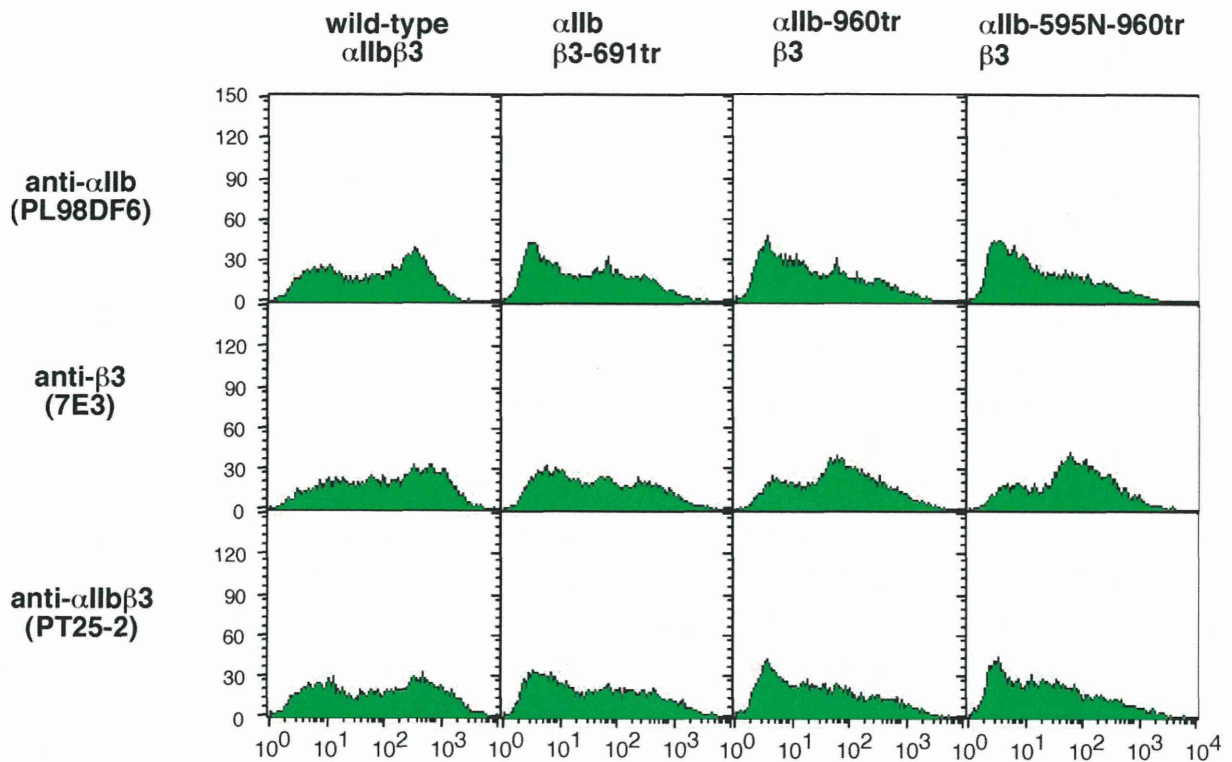


図 1 6. 膜貫通ドメイン欠損が α IIb β 3 発現に与える影響

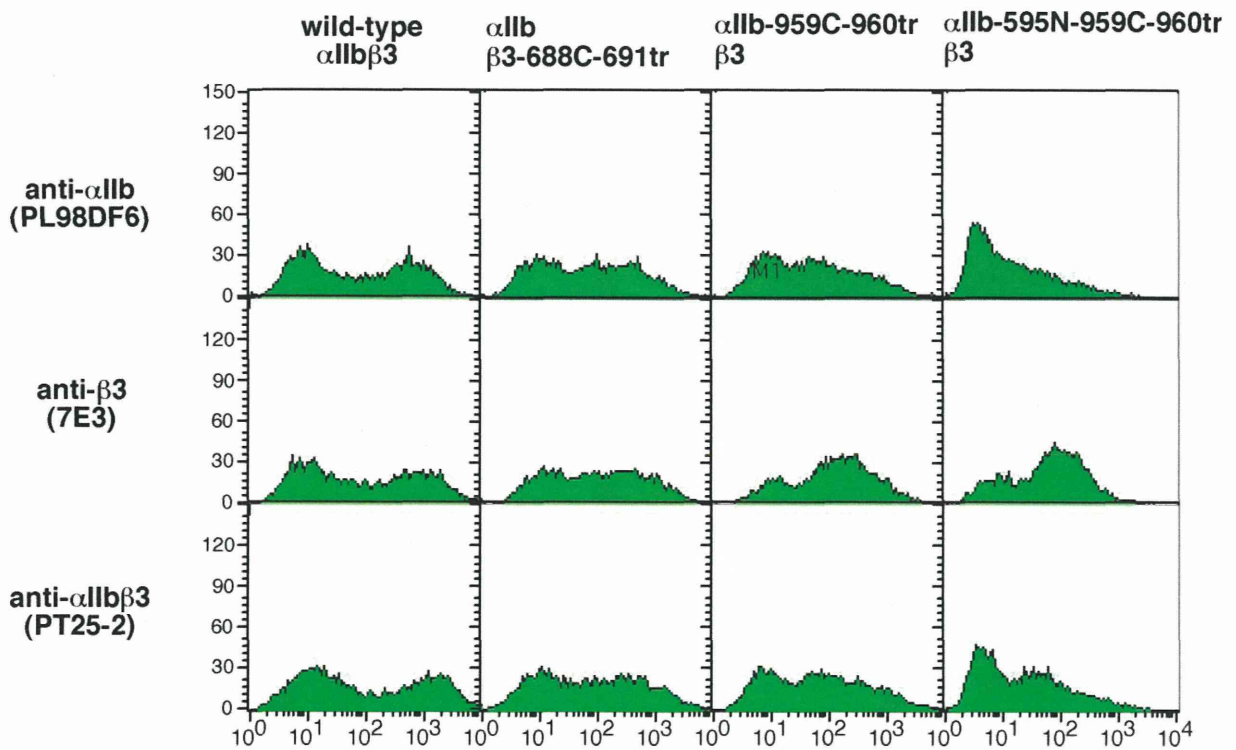


図 1 7. 膜貫通ドメイン欠損と Cys 変異が α IIb β 3 発現に与える影響

ものの、野生型 α IIB β 3 (sol-wt ; α IIB-960tr/ β 3-691tr) に比べ Q595NTT 変異体 (sol-Q595NTT ; α IIB-595N-960tr/ β 3-691tr) の発現量は若干低下していた。一方、 α IIB と β 3 の間に人工的なジスルフィド結合を導入したものでは、 α IIB と β 3 が共有結合で結合しているため SDS-PAGE 上でも解離しない。このため大部分は分子量約 250kDa のバンドとして検出されたが、一部は 85kDa のバンドとして検出された (図 1 8 右)。発現量ではジスルフィド結合をもたないものと同様の傾向がみられ、野生型 α IIB β 3 (sol-wt-cl ; α IIB-959C-960tr/ β 3-688C-691tr) に比べ Q595NTT 変異体 (sol-Q595NTT-cl ; α IIB-595N-959C-960tr/ β 3-688C-691tr) の発現は低下していた。

次に、培養時間が可溶性 α IIB β 3 の産生量に与える影響を検討した。図 1 9 左は

CHO 細胞に可溶性 α IIB β 3 遺伝子を導入した後の培養時間と産生量の変化を表したものである。導入した遺伝子は、人工的なジスルフィド結合をもつ sol-Q595NTT-cl (α IIB-595N-959C-960tr/ β 3-688C-691tr) である。培養上清 10 μ l を SDS-PAGE で展開した後 PVDF 膜に転写し、anti- β 3 mAb の VNR5-2 を用いて培養上清中の β 3 を可視化した。遺伝子導入後 48 時間から 5 日まで産生量は増加するが、その後は変化しないことがわかった。また、 α IIB とジスルフィド結合を形成していない β 3 (分子量 85kDa) も、培養時間に依存して増加する傾向がみられた。図 1 9 右は可溶性 α IIB β 3 産生量がほぼピークに達する培養 4 日目の培養上清中の β 3 を可視化したものである。人工的に導入したジスルフィド結合の有無は、タンパク産生量に大きな影響は与えなかった。しかし、Q595NTT 変異の有無は、

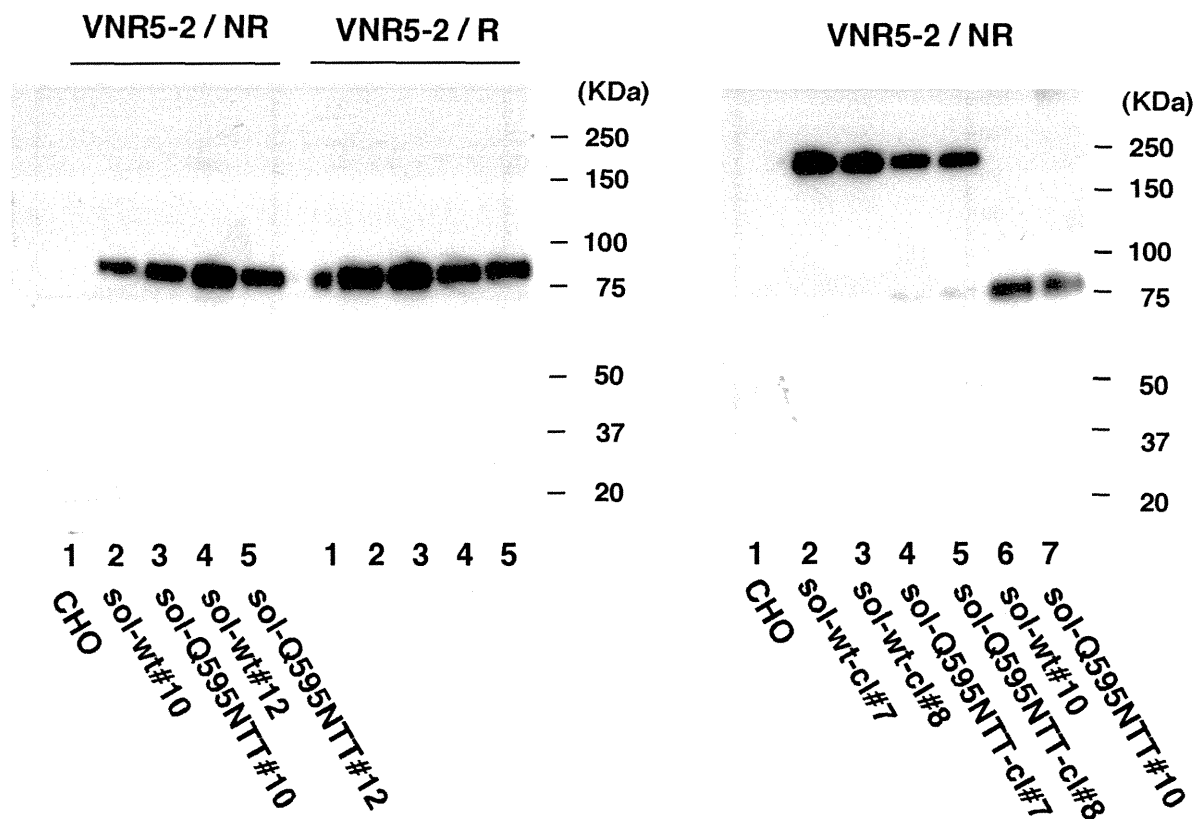


図 1 8. 可溶性 α IIB β 3 の発現

産生量に大きく影響することがわかった。これらの結果は II の FACS を用いた解析結果と一致しており、Q595NTT 変異が可溶性 α IIb β 3 産生に悪影響を及ぼすことが確認された。

X. 可溶性 α IIb β 3 の精製

産生量の違いは有るものの、可溶性 α IIb β 3 が産生可能であることがわかった。次のステップでは、可溶性 α IIb β 3 を培養上清中から精製し、濃縮することを試みた。遺伝子導入後 5 日を経過した培養上清 50ml を回収し、RGD-Sepharose Beads 5 ml と 4°C にて一晩転倒混和した。遠心して

培養上清をとり除き、Beads を洗浄した後、5mM EDTA を含んだバッファー 5ml と混和して結合したタンパクを溶出した。同様の操作を 4 回繰り返して行った。図 6 は培養上清、素通り、溶出液の各分画 10 μ l 中の α IIb β 3 をウェスタンブロット法で調べたものである。培養上清からは分子量 85kDa のバンドが検出された。素通り分画からも同じ分子量のバンドが検出されたが、培養上清に比べその量はほとんど減少していなかった。溶出液分画からも 85kDa のバンドが検出されたものの、その量は極めて少なかった。

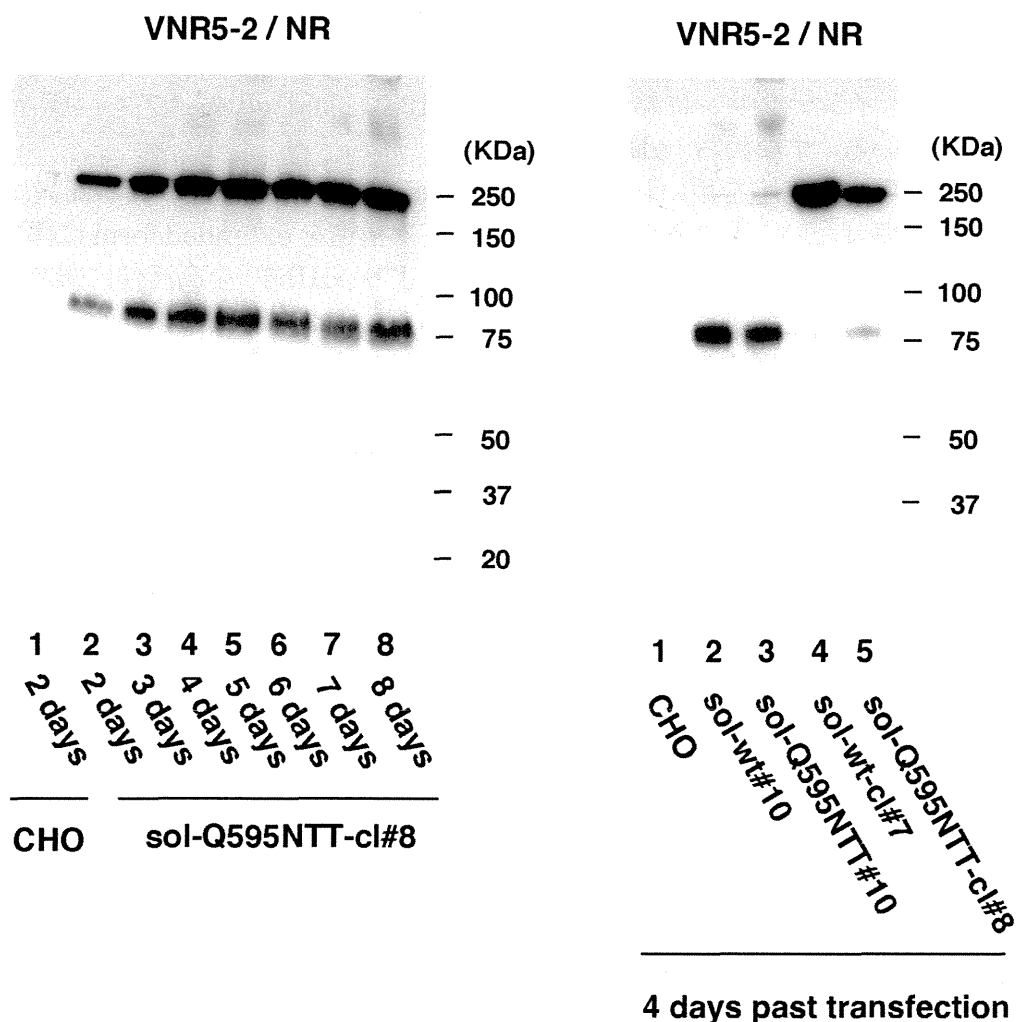


図 19. 可溶性 α IIb β 3 発現量の経時的変化

D. 考察

本研究の目的は、H12V 製剤の機能を予測する上で、信頼性の高い評価法を確立することである。H12V は血小板に結合してその止血能を高めると考えられる。よって、H12V 製剤と血小板の結合を正確に測定することができれば、製剤の安定性・機能を客観的に評価することが可能と考えられる。しかし血小板機能は個人差がある他に、採取条件による影響を大きく受ける。本研究では血小板に代わる測定法として、 α IIb β 3 発現細胞を用いる測定法と、 α IIb β 3 を用いる無細胞系の測定法を行い検討した。

H12V は、フィブリノーゲンのガンマ鎖 C 末端のペプチド部分をリポソーム膜に固定したものである。このペプチドは血小板膜表面の α IIb β 3 インテグリンに結合することがわかっている。すなわち、 α IIb β 3 インテグリンを発現する細胞を用いれば血小板を使用する必要はない。ところが、生理的に存在する細胞で α IIb β 3 インテグリンを発現するのは血小板と骨髄巨核球のみである。また、 α IIb β 3 を発現する巨核球系の培養細胞株の数は少なく、 α IIb β 3 発現量も高くないため測定に用いるには適さない。これらの理由から、ヒト α IIb β 3 を人工的に強制発現させた細胞を作成し、測定に使用した。一過性発現系では非常に高い α IIb β 3 発現量をもった細胞を得ることが可能であった。この細胞と DiOC18 標識した H12V との結合を FACS にて測定したところ、結合の Kd 値や Bmax 値などのパラメータの測定が可能であった。これらの値は α IIb β 3 の活性に依存する。 α IIb β 3 を活性化する方法として、活性化抗体である PT25-2 を使用する方法があるが、結果が PT25-2 の活性に依存するため、PT25-2 製剤のバッチによっては異なる結果が生じる。そこで PT25-2 に依存しない方法として、はじめから高活性を有する α IIb β 3 の変異体

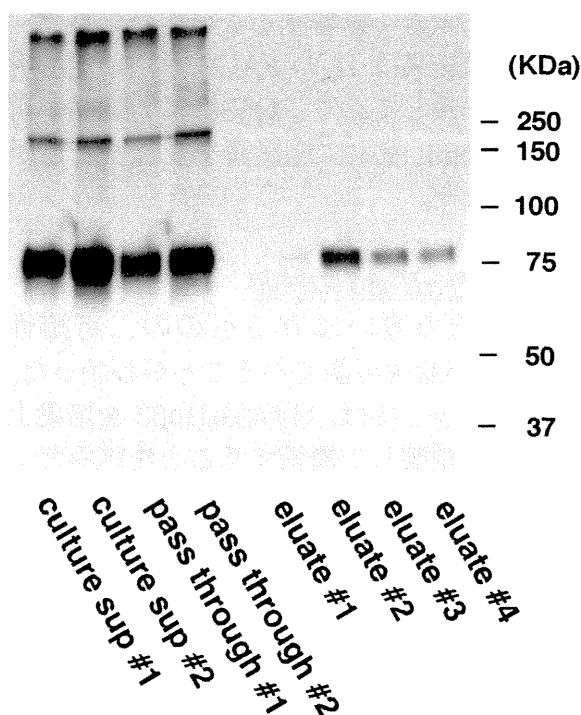


図 20. 可溶性 α IIb β 3 のアフィニティー精製

Q595NTT を使用した。この変異は α IIb 鎖の高次構造を extended form に固定することにより、 α IIb β 3 を高活性に維持する変異である。図 2 に示したように、PT25-2 を使用しなくても再現性の高い結合が測定された。以上のように、Q595NTT 変異体の一過性発現細胞を使用した測定法は信頼性の高い測定法と言える。しかし、この細胞の発現は一過性であるため、測定毎に新たに細胞に α IIb β 3 遺伝子を導入しなければならない。また、 α IIb β 3 の発現量は毎回異なるため、一定の発現量を持った細胞との結合を調べるためには、毎回 α IIb β 3 の発現量を測定し、その値で結合量を補正するなどの手間が必要である。一方、安定発現細胞は作成するためある程度時間が必要であるが、一旦作成してしまえば、毎回同一の α IIb β 3 発現量を持った細胞と H12V の結合を調べることができるため再現性に優れる。しかし、外来性の遺伝子を多量に発現した細胞は増殖速度が遅いため、実際には α IIb β 3 を多量に発現した細胞の作成は

は α I**Ib** β 3 を多量に発現した細胞の作成は困難であることが予想される。実際にわれわれは Q595NTT 変異体を安定発現した細胞株を作成し (図 3)、DiOC18 標識 H12V との結合を FACS にて測定したが、一過性発現細胞に比べて α I**Ib** β 3 発現量が 1/4~1/5 であるため H12V の結合量が低く、信頼性のあるパラメータを算出することができなかつた (図 4)。

α I**Ib** β 3 発現細胞を用いる他の方法として、LigandTracer を用いた測定法を検討した。この方法では FACS と同様に蛍光標識したリガンドと細胞の結合を測定する。異なるのは、FACS が細胞一個あたりの個別の結合量を測定できるのに対して、LigandTracer はディッシュに接着した細胞集団へのリガンドの結合を測定する。よって細胞株の α I**Ib** β 3 発現量が問題となるが、図 5 に示したように、Q595NTT 安定発現細胞株と FITC 標識フィブリノーゲンの結合は十分に検出可能であった。LigandTracer の大きな利点はリガンドの結合を経時的に測定することができることであり、結合の親和性だけでなく速度定数の算出が可能であることである。この方法がうまく稼働すれば、FACS 以上の結合情報を得ることができるため、H12V の機能測定に大きく貢献できるだろう。しかし、この方法ではディッシュ自体にリガンドが吸着されないことが大前提である。また測定時間が長く、細胞の viability が問題となるなど、まだ検討すべき点が多い。

α I**Ib** β 3 発現細胞を用いた測定系では、細胞の viability が常に問題となる。また、H12V を化学標識する必要があるため、この化学標識が H12V に与える影響が問題となる。FACS による分析では、H12V の蛍光標識は均一に行われず二峰性を呈していた。特に二つの蛍光強度のピーク値が 100 倍近く異なることを考慮すると、蛍光標識が H12V の機能に与える影響は無視できな

い。よって、理想的には細胞を使用せず、H12V の化学標識も必要としない測定系の開発が求められる。

SPR 法は、 α I**Ib** β 3 インテグリンと H12V の結合を直接測定する無細胞系測定法である。この方法では生きた細胞を使用せず、H12V の標識も必要ないため、再現性の高い結果を得る事ができると考えられる。この方法では、 α I**Ib** β 3 を CM5 センサーチップに固定化し、その上に H12V を注入して結合する際に生じる質量変化 (SPR の変化) を経時的に測定する。これにより、結合速度定数、解離速度定数の算出が可能となる。この方法で最も問題となるのが、高純度の α I**Ib** β 3 インテグリンをセンサーチップに固定化することである。 α I**Ib** β 3 発現細胞株から α I**Ib** β 3 を抽出するためには、界面活性剤で細胞膜を可溶化し、そこから α I**Ib** β 3 のみを精製しなければならない。細胞溶解液には α I**Ib** β 3 の他に、多くの膜タンパク質が混入しているためである。はじめに、細胞溶解液から直接 α I**Ib** β 3 をセンサーチップに固定化することを試みた。方法は、センサーチップに精製した抗 α I**Ib** β 3 モノクローナル抗体を固定化し、このセンサーチップ上に α I**Ib** β 3 発現細胞の細胞溶解液を注入することによって、 α I**Ib** β 3 のみを選択的にチップ上に捕捉する。この方法では、細胞溶解液から α I**Ib** β 3 を精製する煩雑な過程を回避しすることができるため、有用と考えられた。しかし、センサーチップへの抗 α I**Ib** β 3 モノクローナル抗体 (VNR5-2) の固定化は成功したものの、細胞溶解液からの α I**Ib** β 3 の補足は全く観察されなかつた (図 8)。原因として、細胞溶解液中の α I**Ib** β 3 濃度が低いことが考えられた。そこで α I**Ib** β 3 発現細胞から α I**Ib** β 3 をアフィニティー精製し濃縮することにした。まず、GRGDS ペプチドを Sepharose 4 beads に固定化した。 α I**Ib** β 3 発現細胞

(Q595NTT#48) を界面活性剤で可溶化して遠心し、可溶性画分と作製した beads を混和した。Beads を緩衝液で洗浄した後、5 mM EDTA を含む緩衝液と混和して、結合した α I**Ib** β 3 を抽出した。図 9 は、この方法で精製した α I**Ib** β 3 をウエスタンブロット法で解析したものである。 α I**Ib**、 β 3 とともに目的の分子量をもつことが確認された。しかし、抗 β 3 抗体 VNR5-2 に比べ、抗 α I**Ib** 抗体 PL98DF6 と精製 α I**Ib** β 3 の反応性が極めて悪かった。この精製 α I**Ib** β 3 の濃度を BCA 法で測定したところ、固定化に必要な十分な濃度であった。次に、VNR5-2 を固定化したセンサーチップ上に精製 α I**Ib** β 3 を注入し、 α I**Ib** β 3 の補足を試みた。われわれの予想に反し、 α I**Ib** β 3 の補足は全く観察されなかった (図 10)。そこで VNR5-2 を介さず、精製 α I**Ib** β 3 をセンサーチップに直接固定化することにした。図 11 に示したように、十分な量の α I**Ib** β 3 が固定化された。次に、濃度 0.1、0.2、0.5、1.0 mg/ml の H12V を注入し、固定化した α I**Ib** β 3 との結合を観察した。しかし、SPR シグナルの変化は全く認められなかった (図 12)。過去の FACS による結合解析における Q595NTT 発現細胞と H12V の解離定数は 1~2 mg/ml であり、H12V 濃度 1 mg/ml は結合に十分であると考えられる。奇妙なことに、抗 α I**Ib** β 3 モノクローナル抗体である PL98DF6、VNR5-2 を注入しても、センサーチップへの結合は観察されなかった (図 13、14)。これらの結果は α I**Ib** β 3 が精製の過程で変性した可能性を示唆している。元来、 α I**Ib** β 3 インテグリンは膜タンパクであり、精製の過程で界面活性剤を使用しなければならない。本研究で用いた界面活性剤は n-octylgluco-pyranoside であり、インテグリン精製に標準的に用いられている。また、本研究ではアフィニティークラムを用いて、機能的に intact な α I**Ib** β 3 のみを精製しているため、変性した α I**Ib** β 3

が多量に混入している可能性は低いと考えられる。しかし、変性条件下 (イムノブロット)、非変性条件下で抗 α I**Ib** β 3 抗体の結合が低下していることを考慮すると、 α I**Ib** β 3 の溶出~センサーチップへの固定化の段階で変性したと考えるのが妥当である。これまでもインテグリンとリガンドの結合を、SPR 法で測定した報告はなされているが、これらの報告の全てにおいて使用されているのは、膜貫通ドメインから C 末端を人工的に欠損した可溶性インテグリンであり、細胞溶解液から精製したインテグリンを用いた例はない。また、他の膜タンパクでは、界面活性剤の使用でタンパクの高次構造が影響を受けることが知られている。

そこで界面活性剤を使用せずに α I**Ib** β 3 を精製する方法を試みた。 α I**Ib** β 3 は細胞膜を一回貫通する I 型膜タンパク質である。このため α I**Ib** β 3 を精製するためには、界面活性剤を用いて細胞膜を可溶化しなければならない。この過程を回避するため、予め膜貫通ドメイン以降のアミノ酸配列を欠損し、細胞外に分泌される可溶性 α I**Ib** β 3 の作成を行った。遺伝子組み換え技術を用いて α I**Ib** 鎖、 β 3 鎖のそれぞれの膜貫通ドメイン手前のアミノ酸残基に停止コドンを導入し、全部で 4 種類の可溶性 α I**Ib** β 3 を設計した (図 15)。一つは膜貫通ドメイン以降を欠損するのみで、それ以外は野生型と同じ配列をもつ sol-wt (α I**Ib**-960tr/ β 3-691tr)、もう一つは α I**Ib** 鎖の細胞外ドメインに高活性型の Q595NTT 変異をもつ sol-Q595NTT (α I**Ib**-595N-960tr/ β 3-691tr) である。そして、これらの α I**Ib** 鎖と β 3 鎖の C 末端が互いにジスルフィド結合で結合した sol-wt-cl (α I**Ib**-959C-960tr/ β 3-688C-691tr)、sol-Q595NTT-cl (α I**Ib**-595N-959C-960tr/ β 3-688C-691tr) である。これらの可溶性 α I**Ib** β 3 は細胞膜に留まらないため FACS による発現量解析は不可能である。そこで α I**Ib** 鎖と β 3 鎖のどちらか片方

を野生型とすることで細胞膜表面での発現を可能とし、FACS で変異を導入した鎖の発現量の比較を行った。β3 鎖の膜貫通ドメイン以降を欠損した β3-691tr、β3-688C-691tr は、欠損しない野生型β3 に比べ発現量は低下していた。αIIb 鎖の膜貫通ドメイン以降を欠損した αIIb-960tr、αIIb-959C-960tr でも、欠損しない野生型 αIIb に比べて発現量低下がみられた (図 1 6)。細胞外ドメインに Q595NTT 変異をもつ αIIb-595N-960tr、αIIb-595N-959C-960tr では、更なる発現量の低下が認められた (図 1 7)。これらの結果は、膜貫通ドメイン以降の欠損、C 末端の Cys 変異は、αIIb 鎖とβ3 鎖の発現に軽度ではあるが悪影響を及ぼすことがわかった。さらに、Q595NTT 変異はこれらの変異と組み合わせることにより αIIb 鎖の発現に大きな影響を与えることが判明した。本研究で使用する αIIbβ3 では、構造変化に起因する活性変化を可能な限り抑制しなければならない。Q595NTT は αIIb 鎖の高次構造を extended form に固定することにより、αIIbβ3 を高活性に維持する変異である。従って、本研究で用いる αIIbβ3 には無くてはならない変異であるため、以後もこの変異を含めた検討を行った。

次に、αIIb 鎖とβ3 鎖の双方の膜貫通ドメイン以降を欠損した変異体を CHO 細胞に発現し、培養上清中に分泌された αIIbβ3 の分析を行った。ウエスタンブロット法による解析では、使用したクローンによる差はあるものの、sol-wt、sol-Q595NTT の上清中の発現量はほぼ同じであった (図 1 8)。一方、FACS による解析で発現量低下が懸念された sol-Q595NTT-cl も培養上清中の発現が確認された。発現量は Q595NTT を持たない sol-wt-cl に比べ約半分に低下していた。sol-wt-cl、sol-Q595NTT-cl は、αIIb 鎖とβ3 鎖が C 末端でジスルフィド結合を形成しているため、分子量約 250kDa のタ

ンパクとして認識された。わずかではあるが、ジスルフィド結合を形成しない分子量約 85kDa のバンドも確認された (図 1 8)。これらの発現はトランスフェクションしてから 48 時間後の培養上清中のものである。そこでトランスフェクション後、何日目に培養上清中の発現が最大になるかを調べるため、経時的な発現量の変化を調べた (図 1 9)。その結果、トランスフェクション後 4 日から 5 日まで発現量は増加し、その後は変化しないことが判明した。トランスフェクション後 4 日目の発現を比べた結果では、sol-wt と sol-Q595NTT の発現量はほぼ同じであった。sol-wt-cl と sol-Q595NTT-cl の比較では、sol-wt-cl に比べて sol-Q595NTT-cl の発現量は約半分に低下していた (図 1 9)。しかし、sol-Q595NTT-cl の発現は sol-wt や sol-Q595NTT とほぼ同等であり、実用可能と考えられた。

最後に、培養上清中の可溶性 αIIbβ3 の精製を試みた。sol-Q595NTT をトランスフェクションし、5 日後の培養上清 50ml を前年度に作成した RGD-Sepharose Beads 5ml と一晩振盪混和した。Beads を緩衝液で洗浄した後、5 mM EDTA を含む緩衝液 5ml と混和して結合した αIIbβ3 を溶出した。この溶出を四回繰り返した。図 2 0 は培養上清、素通り分画、溶出液分画の各 10μl をイムノブロット法で解析したものである。培養日時の異なる培養上清 culture sup #1、#2 とそれぞれの素通り分画である pass through #1、pass through #2 を比較すると、RGD カラム前後で αIIbβ3 量の変化はほとんど無く、大部分が RGD-Sepharose Beads と結合せず素通り分画に残存していることが判明した。溶出液分画の分析では、一回目の分画には、ごく僅かの αIIbβ3 しか存在せず、二回目で最大となり、以降は減少していた。このことは、5 mM EDTA では培養液中の二価イオ

ンを除去しきれなかったことを示唆している。Bead に結合した α IIb β 3 を溶出するためには、より高濃度の EDTA を使用する必要があると考えられる。また、溶出した α IIb β 3 は培養上清中に存在したものに比べきわめて少量であった。このことは RGD-Sepharose Beads の RGD ペプチド結合量に問題があったことを示唆している。十分な量の RGD ペプチドを結合したカラムを使用することにより、可溶性 α IIb β 3 の精製は可能と考えられる。

E. 結論

血小板を用いない H12V 結合測定法を検討した。 α IIb β 3 発現細胞を用いる FACS、LigandTracer による測定法では、解離定数などの結合パラメータを得ることができた。しかし、結果が細胞の viability に影響される、H12V を化学標識する必要があるなどの問題が残った。一方、SPR 法にて H12V と高活性型 α IIb β 3 (Q595NTT) の結合を測定する方法は、測定に伴う不確定要因が最も少なく、再現性に優れた方法と考えられる。しかし、 α IIb β 3 の精製法に問題があり、 α IIb β 3 発現細胞から界面活性剤を用いて精製した α IIb β 3 は変性をきたしていた。この問題を回避するため作製した可溶性 α IIb β 3 は細胞外に分泌され、RGD カラムによるアフィニティー精製が可能であることが分かった。この可溶性 α IIb β 3 を用いることで、 α IIb β 3 と H12V の直接結合が測定可能になると期待される。

F. 研究発表

1 論文発表 : Kamata T, Handa M, Takakuwa S, Sato Y, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for α V β 3 integrin. PLoS One 8(6):e66096, 2013

2 学会発表: Kamata T, Handa M, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Divalent cations define the

structural requirement for activation in α IIb β 3 integrin. The 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012

G. 知的財産権の出願・登録 : 無し。

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻(号)	ページ	出版年
Taguchi K, Hashimoto M, Ogaki S, Watanabe H, <u>Takeoka S</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Handa M</u> , Otagiri M, <u>Maruyama T</u>	Effect of repeated injections of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with a fibrinogen γ -chain dodecapeptide developed as a synthetic platelet substitute on accelerated blood clearance in a healthy and an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model.	<i>J Pharm Sci</i>	On line	doi: 10.1002 /jps.24 418	in press
Hagisawa K, Nishikawa K, Yanagawa R, <u>Kinoshita M</u> , Doi M, <u>Suzuki H</u> , Iwaya K, Saitoh D, Seki S, <u>Takeoka S</u> , <u>Handa M</u> , Nishida Y.	Treatment with fibrinogen γ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes as an infusible haemostatic agent against active liver bleeding in acute thrombocytopenic rabbits	<i>Transfusion</i>	55 (2)	314-25	2015
木下 学	人工赤血球、人工血小板の臨床応用	<i>A net</i>	18 (1)	14-7	2014
萩沢康介, <u>木下 学</u> , 宮脇博基, 佐藤俊一, 鈴木英紀, 土井麻実, <u>武岡真司</u> , 小野 聡, 齋藤大蔵, 西田育弘	衝撃波による致死性の肺出血マウスに対する人工血小板(H12(ADP) liposome)の救命効果	<i>Shock</i>	29 (2)	1-8	2014
<u>半田誠</u>	人工血小板開発の現状と今後の展望	<i>日病薬誌</i>	49 (9)	949-53	2013
<u>Kamata T</u> , <u>Handa M</u> , Takakuwa S, <u>Sato Y</u> , Kawai Y, <u>Ikeda Y</u> , Aiso S	Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for $\alpha V\beta 3$ integrin	<i>Plos One</i>	8 (6)	e66096	2013
Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, <u>Takeoka S</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Handa M</u> , Otagiri M, <u>Maruyama T</u> .	Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model	<i>J Pharm Sci</i>	102 (10)	3852-9	2013
Taguchi K, Ujihira H, Katsuno S, <u>Takeoka S</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Handa M</u> , Otagiri M, <u>Maruyama T</u> .	Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute	<i>Drug Metab Dispos</i>	41 (8)	1584-91	2013

岡村陽介、半田 誠	ナノ粒子と血小板の相互作用/完全人工系血小板代替物への応用を目指して	<i>Int Rev Thromb</i>	8 (1)	34-41	2013
Nishikawa K, Hagisawa K, <u>Kinoshita M</u> , Shono S, Katsuno S, Doi M, Yanagawa R, <u>Suzuki H</u> , Iwaya K, Saitoh D, Sakamoto T, Seki S, <u>Takeoka S</u> , <u>Handa M</u> .	Fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage	<i>J. Thromb Haemost</i>	10 (10)	2137-21 48	2012
Tokutomi K, Tagawa T, Korenaga M, Chiba M, Asai T, Watanabe N, <u>Takeoka S</u> , <u>Handa M</u> , <u>Ikeda Y</u> , Okud	Ability of fibrinogen γ -derived dodecapeptides with different sequences to bind to rat platelets	<i>Int. J. Pharmaceutics</i>	438 (1-2)	296 - 301	2012

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別冊

Effect of Repeated Injections of Adenosine Diphosphate-Encapsulated Liposomes Coated with a Fibrinogen γ -Chain Dodecapeptide Developed as a Synthetic Platelet Substitute on Accelerated Blood Clearance in a Healthy and an Anticancer Drug-Induced Thrombocytopenia Rat Model

KAZUAKI TAGUCHI,¹ MAI HASHIMOTO,² SHIGERU OGAKI,² HIROSHI WATANABE,^{2,3} SHINJI TAKEOKA,⁴ YASUO IKEDA,⁴ MAKOTO HANDA,⁵ MASAKI OTAGIRI,^{1,2,6} TORU MARUYAMA^{2,3}

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, Nishi-ku, Kumamoto 862-0082, Japan

²Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan

³Center for Clinical Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan

⁴Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan

⁵Center for Transfusion Medicine and Cell Therapy, Keio University, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

⁶DDS Research Institute, Sojo University, Nishi-ku, Kumamoto 862-0082, Japan

Received 25 December 2014; revised 16 February 2015; accepted 17 February 2015

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.24418

ABSTRACT: Adenosine diphosphate (ADP)-encapsulated liposomes coated with a fibrinogen γ -chain dodecapeptide [H12 (dodecapeptide (⁴⁰⁰HHLGGAKQAGDV⁴¹¹))-ADP]-liposome] is a synthetic platelet substitute, in which the surface is covered with polyethylene glycol (PEG). It has been reported that repeated injections of PEGylated liposomes induce an accelerated blood clearance (ABC) phenomenon, which involves a loss in the long-circulation half-life of the material when administered repeatedly to the same animals. The objective of this study was to determine whether the ABC phenomenon was induced by repeated injections of H12-(ADP)-liposome in healthy and anticancer drug-induced thrombocytopenia model rats. The findings show that the ABC phenomenon was induced by healthy rats that were repeatedly injected with H12-(ADP)-liposomes at the interval of 5 days at a dose of 10 mg lipids/kg. The ABC phenomenon involves the production of anti-H12-(ADP)-liposome immunoglobulin M (IgM) and complement activation. On the other hand, when thrombocytopenia model rats were repeatedly injected with H12-(ADP)-liposomes under the same conditions, no ABC phenomenon, nor was any suppression of anti-H12-(ADP)-liposome IgM-mediated complement activation observed. We thus conclude that the repeated injection of H12-(ADP)-liposome treatment in rat model with anticancer drug-induced thrombocytopenia did not induce the ABC phenomenon. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association J Pharm Sci

Keywords: liposome; adenosine-diphosphate; dodecapeptide; accelerated blood clearance phenomenon; thrombocytopenia; platelet substitute; pegylation; disposition; clearance; pharmacokinetics

INTRODUCTION

To further enhance the quality and efficiency of drug delivery substances, they are frequently modified with polyethylene glycol (PEG).¹ There is now little doubt that PEGylation is useful and is in widespread use because it results in a prolonged half-life, a higher stability and a lower immunogenicity. In fact, some of PEGylated products, such as PEGylated epoetin- β ² and a PEGylated liposomal formulation of doxorubicin,³ take advantage

of these characteristics, and have been approved for use in clinical settings.

However, it is widely known that the intravenous injection of PEGylated products, including liposomes and micelles, causes a second dose of PEGylated products to lose their long-circulating characteristics and accumulate in the liver, when administered twice in the same animal [referred to as the “accelerated blood clearance (ABC) phenomenon”].⁴ This phenomenon has been reported for a number of animal species, including rhesus monkeys, dogs, rabbits, guinea pigs, rats, and mice.^{4–7} Moreover, Ishida and coworkers^{8,9} reported that the abundant secretion of anti-PEG immunoglobulin M (IgM), produced by the spleen in response to the first dose of PEGylated liposomes, plays a crucial role in the induction of the ABC phenomenon. Interestingly, the probable existence of naturally occurring anti-PEG antibodies in human beings has also been reported,^{10,11} which indicate that repeated injections of PEGylated products might induce the ABC phenomenon, even in a clinical situation. Therefore, it would be advisable to examine

Abbreviations used: ADP, adenosine diphosphate; H12, dodecapeptide (⁴⁰⁰HHLGGAKQAGDV⁴¹¹); ABC, accelerated blood clearance; PEG, polyethylene glycol; DPPC, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; DHSG, 1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate; DSPE-PEG, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-(monomethoxyPEG); HbV, hemoglobin-vesicles.

Correspondence to: Toru Maruyama (Telephone: +81-96-361-4150; Fax: +81-96-362-7690; E-mail: tomaru@gpo.kumamoto-u.ac.jp)

Kazuaki Taguchi and Mai Hashimoto contributed equally to this work.

Journal of Pharmaceutical Sciences

© 2015 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association

the pharmacokinetic properties of PEGylated products with respect to the effects of repeated injections before the beginning of a clinical trial, because the ABC phenomenon may cause adverse effects or decrease the pharmacological effects of a formulation, because of the development of altered pharmacokinetics of PEGylated products.

The dodecapeptide (⁴⁰⁰HHLGGAKQAGDV⁴¹¹) (H12)-(ADP)-liposome was developed as a synthetic platelet substitute, of which the surface of phospholipid vesicles is modified with PEG. In order to enhance the hemostatic effect, this PEGylated liposome-based artificial platelet substitute bears a synthetic H12 on its surface, corresponding to the carboxy-terminus of the fibrinogen γ -chain, and the physiologic platelet agonist adenosine diphosphate (ADP) in the interior. In fact, it was reported that these modifications enable the liposomes to accumulate at the site of an injury *in vivo* by specifically binding to glycoprotein IIb/IIIa on activated platelet membranes,^{12,13} thus decreasing bleeding time in a dose-dependent manner in both thrombocytopenic rat and rabbit models.^{14,15} Furthermore, we recently reported that H12-(ADP)-liposomes have an adequate circulation time in the blood to permit them to function as a platelet substitute in healthy animals and a thrombocytopenic model rat.^{16,17} Because of these characteristics, H12-(ADP)-liposomes show hemostatic effects comparable to platelet-rich plasma and also result in an improved survival in rabbits with acute thrombocytopenia.^{18,19}

As it is likely that repeated injections of H12-(ADP)-liposome would be required, as a platelet substitute, in clinical settings, the possibility remains that repeated injections of the H12-(ADP)-liposome might induce the ABC phenomenon. If the ABC phenomenon were induced by repeated injections, then the hemostatic effects of H12-(ADP)-liposomes could be compromised. In addition, changes in the pharmacokinetic properties of H12-(ADP)-liposomes may cause unexpected adverse effects. Therefore, clarifying the pharmacokinetics of H12-(ADP)-liposomes after repeated injections at a dose is effective for producing therapeutic effects in animal studies, and thereby for possible use in clinical settings as a platelet substitute should provide useful information for future clinical applications.

In the present study, we investigated the issue of whether the first injection of H12-(ADP)-liposome at a dose of 10 mg lipids/kg that is proposed for use in clinical practice as a platelet substitute affects the pharmacokinetic behavior of H12-(ADP)-liposome after the second injection in healthy rats and rats models of an adaptation disease (thrombocytopenia). In addition, we also investigated the issue of whether anti-H12-(ADP)-liposome IgM-mediated complement activation occurs after the first injection, and which lipid component of the H12-(ADP)-liposome is recognized by IgM.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Cholesterol and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) were purchased from Nippon Fine Chemical (Osaka, Japan), and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-(monomethoxyPEG) (PEG-DSPE, 5.1 kDa) was from NOF (Tokyo, Japan). 1,5-Dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) and H12-PEG-Glu2C18, in which the fibrinogen γ -chain dodecapeptide

(C-HHLGGAKQAGDV, Cys-H12) was conjugated to the end of the PEG lipids, were synthesized as reported previously.²⁰

Preparation of ¹⁴C, ³H Double-Labeled H12-(ADP)-Liposomes

¹⁴C, ³H double-labeled H12-(ADP)-liposomes were prepared as previously reported.¹⁶ The diameter and zeta-potential of the ¹⁴C-labeled H12-(ADP)-liposomes used in this study were in the range of 250 ± 50 nm and -10 ± 0.9 mV, respectively. Before being used in pharmacokinetic experiments, all of the samples were mixed with unlabeled H12-(ADP)-liposomes. The 5%–10% of added 1 mM ADP was encapsulated in the inner space of the vesicle.

The Pharmacokinetic Experimental Protocol in Healthy Rats

All animal experiments were undertaken in accordance with the guidelines principles and procedures of Kumamoto University for the care and use of laboratory animals. All animals were maintained under conventional housing conditions, with food and water *ad libitum* in a temperature-controlled room with a 12-h dark/light cycle. All male Sprague–Dawley (SD) rats (270–300 g) were purchased from Kyudou Company (Kumamoto, Japan).

Eight male SD rats were anesthetized using ether and received a single injection of a nonlabeled H12-(ADP)-liposomes (10 mg lipids/kg) via the tail vein. This dose is lowest recommended dosage to exert a sufficient hematostatic effect in thrombocytopenic rats.¹⁴ Five days after the first injection of the nonlabeled H12-(ADP)-liposomes, the same SD rats received a ¹⁴C, ³H-labeled H12-(ADP)-liposomes (10 mg lipids/kg) via the tail vein under ether anesthesia. Four rats were randomly selected to undergo a plasma concentration test. Under ether anesthesia, approximately 200 μ L of a blood sample from all administered groups were collected from the tail vein at multiple time points after the injection of the ¹⁴C, ³H-labeled H12-(ADP)-liposomes (3, 10, 30 min, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h) and the plasma was separated by centrifugation (3000g, 5 min). An additional four rats were sacrificed and their livers were collected at 2 h after an injection of ¹⁴C, ³H-labeled H12-(ADP)-liposomes.

Pharmacokinetic Studies in Thrombocytopenic Rats

Thrombocytopenic rats induced by busulphan (Sigma–Aldrich, St Louis, Missouri) treatment were created as in our previous report.¹⁷ Ten days after the final administration of busulphan, eight thrombocytopenic rats were anesthetized with ether and given a single injection of nonlabeled H12-(ADP)-liposomes (10 mg lipids/kg) via the tail vein. Five days after the first injection of the nonlabeled H12-(ADP)-liposomes, the same thrombocytopenic rats received ¹⁴C, ³H-labeled H12-(ADP)-liposomes (10 mg lipids/kg) via the tail vein under ether anesthesia. Four rats were randomly selected to undergo a plasma concentration test. Under ether anesthesia, approximately 200 μ L blood sample from all administered groups were collected from the tail vein at multiple time points after the injection of the ¹⁴C, ³H-labeled H12-(ADP)-liposomes (3, 10, 30 min, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h) and the plasma was separated by centrifugation (3000g, 5 min). An additional four thrombocytopenic rats were sacrificed and their livers were collected 2 h after an injection of ¹⁴C, ³H-labeled H12-(ADP)-liposomes.

Measurement of ^{14}C and ^3H Radioactivity

The ^{14}C , ^3H radioactivity in plasma and livers were determined by liquid scintillation counting (LSC-5121; Aloka, Tokyo, Japan) with Hionic Fluor (Perkin Elmer, Yokohama, Japan) as previously reported.¹⁶

Quantitative Determination of Anti-H12-(ADP)-Liposome IgM

Normal ($n = 4$) or thrombocytopenic rats ($n = 4$) were injected with H12-(ADP)-liposome (10 mg lipids/kg) via the tail vein under ether anesthesia. At each time point (1–7, 10, and 14 days) after the injection, blood was collected from the tail vein. Plasma was collected after centrifugation (3000g, 5 min), and was stored at -80°C until used.

ELISA was employed to detect IgM against H12-(ADP)-liposome using a previously described method, with minor modifications.⁶ A 100- μL of 475 ng lipids/mL H12-(ADP)-liposomes (comprising DPPC, cholesterol, DHSG, PEG-DSPE, and H12-PEG-Glu2C18) were added to 96-well plates (NUNC, New York). The plates were incubated for 2 h at 25°C . After incubation, the wells were washed three times with a wash solution (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0). A blocking solution [50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% bovine serum albumin (BSA), pH 8.0] was then added to each well and the plate incubated for 2 h at 25°C . After incubation, the wells were washed three times with wash solution and 100 μL of plasma sample, diluted 1:100 with sample solution (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, 1% BSA, pH 8.0), and were added to the wells. After incubation for 90 min, the wells were washed three times with wash solution and 100 μL of peroxidase-labeled affinity purified antibody to mouse IgM (μ), diluted 1:1000 with sample solution, and were added to each well. After incubation for 60 min, the wells were washed three times with wash solution. Coloration was initiated by adding 100 μL of *o*-phenylene diamine (1 mg/mL). After incubation, the reaction was terminated by adding 100 μL of 1 N H_2SO_4 and the absorbance was measured at 490 nm using a Microplate reader (Model 680; BIO-RAD, Tokyo, Japan).

Quantitative Determination of Anti-Lipid IgM

A 10-nmol aliquot of each lipid (DPPC, cholesterol, DHSG, PEG-DSPE, or H12-PEG-Glu2C18) in 50 μL of 100% ethanol was added to 96-well plates (NUNC). The plates were incubated for 4 h at 37°C to dry completely. Following processes were identical to those described in the *Quantitative Determination of Anti-H12-(ADP)-Liposome IgM* section.

Measurement of Complement Activity (CH50)

Normal rats ($n = 4$) or thrombocytopenic rats ($n = 4$) were injected with H12-(ADP)-liposomes (10 mg lipids/kg) via the tail vein under ether anesthesia. At stipulated time point, blood was collected from the tail vein. The blood was centrifuged (3000g, 5 min) to obtain plasma samples for analysis. All plasma samples were stored at -80°C prior to analysis by a commercial clinical testing laboratory (SRL, Tokyo, Japan). The CH 50 was detected by the method of Mayer.²¹

Data Analysis

A noncompartment model was used for the pharmacokinetic analysis. Each parameter was calculated using the moment

analysis program available on Microsoft Excel. Data are shown as the mean \pm SD for the indicated number of animals. Statistical evaluation of pharmacokinetic data was compared using unpaired Student's *t*-test. Statistical significance of the results for CH50 was tested with paired Student's *t*-test, and any other statistical evaluation among each group was compared using one-way analysis of variance, followed by Bonferroni post hoc test. A probability value of $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Pharmacokinetic Properties of H12-(ADP)-Liposome After Repeated Injection in Healthy Rats

In a previous study, we found that repeated injection of a low dose of hemoglobin-vesicles (HbV), the liposomal characteristics of which were similar in terms of liposomal structure to H12-(ADP)-liposomes, resulted in the induction of the ABC phenomenon accompanied by the production of anti-HbV antibodies.⁶ However, it is well known that a variety of factors, including the lipid dose used, physicochemical properties (degree of PEGylation, PEG chain length, surface charge, and size) and the encapsulated drug of the initially injected liposome, dosing intervals, all can strongly affect the pharmacokinetic response to a subsequent injection.²² It is noteworthy that the end of the PEG lipids on the surface of H12-(ADP)-liposomes is partly modified with H12. Therefore, we first investigated the pharmacokinetic properties of the second injected H12-(ADP)-liposomes in the healthy rats using ^{14}C , ^3H -labeled H12-(ADP)-liposomes, in which the encapsulated ADP and membrane component (cholesterol) were labeled with ^{14}C and ^3H , respectively. The time interval for the injection was selected for 5 days based on a previous report, in which the ABC phenomenon in rats was observed the most strongly, when the time interval for the injection was 4–5 days.²³

Figure 1a shows the time course for the plasma concentration curve for the ^{14}C , ^3H -labeled H12-(ADP)-liposomes administered once or twice to healthy rats at a dose of 10 mg lipids/kg. The plasma concentration curves for ^{14}C radioactivity and ^3H radioactivity indicate that, in the second injection, the radioactivity was rapidly cleared compared with the first injection (Fig. 1a). The plasma clearance for both ^{14}C radioactivity and ^3H radioactivity in the second injection was increased significantly compared with the corresponding values for the first injection (Table 1).

As the second injected PEG-liposomes accumulate at relatively high levels in the liver when the ABC phenomenon occurs,²³ the effect of repeated injections on the hepatic distribution of ^{14}C , ^3H -labeled H12-(ADP)-liposomes was examined. Figure 1b shows the hepatic distribution for ^{14}C and ^3H radioactivity (% of dose/g tissue) at 2 h after the administration of ^{14}C , ^3H -labeled H12-(ADP)-liposomes once or twice to healthy rats at a dose of 10 mg lipids/kg. As expected, the hepatic distribution for both the ^{14}C and ^3H radioactivity in the second injection was much higher than the values for the first injection at 2 h after the administration of ^{14}C , ^3H -labeled H12-(ADP)-liposomes at a dose of 10 mg lipids/kg (Fig. 1b). These results indicate that the ABC phenomenon was clearly induced at 5 days after the injection when healthy rats were injected with H12-(ADP)-liposomes at a dose of 10 mg lipids/kg.

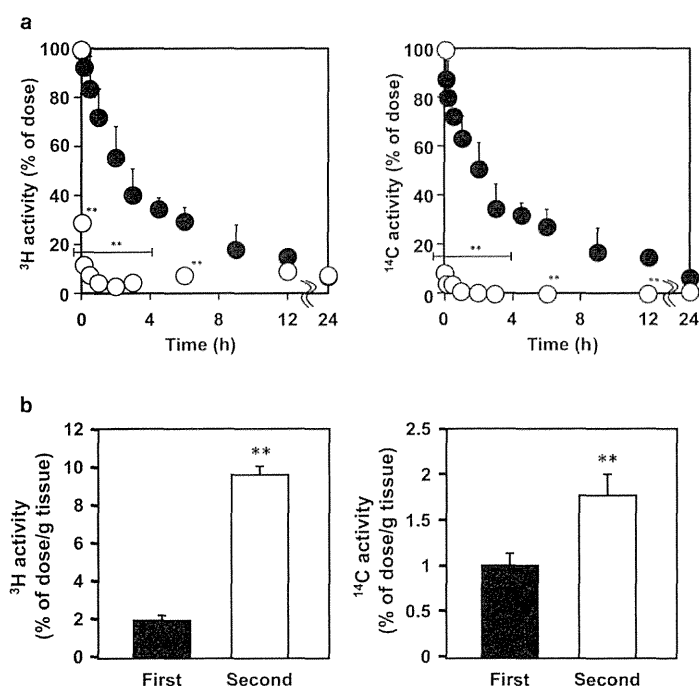


Figure 1. (a) Plasma concentration curve for ^{14}C and ^3H radiolabeled H12-(ADP)-liposomes after the first injection (closed symbol) or the second injection (open symbol) of ^3H , ^{14}C radiolabeled H12-(ADP)-liposome at a dose of 10 mg lipid/kg to healthy rats. (b) The hepatic distribution of ^{14}C and ^3H radioactivity at 2 h after the first injection (closed bar) or the second injection (open bar) of ^3H , ^{14}C radiolabeled H12-(ADP)-liposome at a dose of 10 mg lipid/kg to healthy rats. The data for the first injection were cited from our previously reported paper.¹⁶ Each point represents the mean \pm SD ($n = 4$). ** $p < 0.01$ versus first injection.

Production of IgM Against H12-(ADP)-Liposome and Complement Activity After H12-(ADP)-Liposome Injection in Healthy Rats

It is known that the ABC phenomenon is induced by the selective binding of IgM to the second injected PEGylated liposome, resulting in the activation of complement and consequently an enhanced uptake of the second injected PEGylated liposome, by Kupffer cells via complement receptor-mediated endocytosis.²³ Therefore, we examined the issue of whether IgM against H12-(ADP)-liposomes is elicited by an initial injection of H12-(ADP)-liposome at a dose of 10 mg lipids/kg in healthy rats. Figure 2a shows the values for the quantitative determination of plasma IgM against H12-(ADP)-liposomes after the injection of H12-

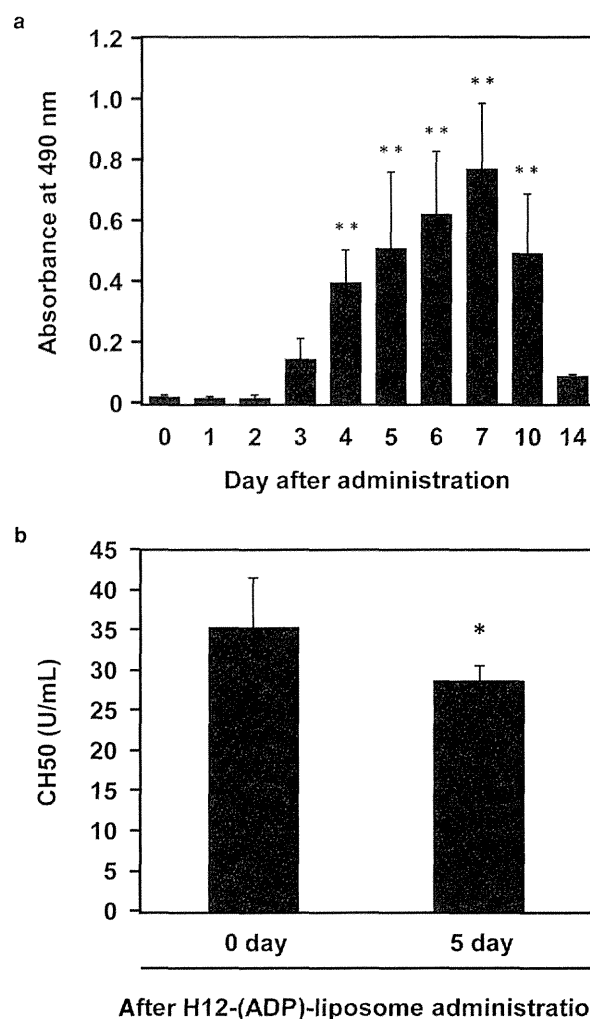


Figure 2. (a) Determination of IgM against H12-(ADP)-liposomes after a single intravenous injection of H12-(ADP)-liposomes at a dose of 10 mg lipid/kg in healthy rats. (b) CH50 values in healthy rats before treatment with H12-(ADP)-liposomes (0 day) or 5 days after a single intravenous injection of H12-(ADP)-liposomes at a dose of 10 mg lipid/kg. Each bar represents the mean \pm SD ($n = 4$). ** $p < 0.01$ versus 0 day, * $p < 0.05$ versus 0 day.

(ADP)-liposomes at a dose of 10 mg lipids/kg in healthy rats. In line with a previous report in which rats were used,²⁴ IgM against H12-(ADP)-liposome was elicited starting from 3 days after the injection of H12-(ADP)-liposomes (Fig. 2a).

Table 1. The Pharmacokinetic Parameters of Inner ADP [(8- ^{14}C)ADP] and Outer Lipids Membranes [(1,2- ^3H (N)-Cholesterol] Derived from ^3H , ^{14}C -Radiolabeled H12-(ADP)-Liposomes After One or Two Intravenous Injections at a Dose of 10 mg Lipids/kg to Normal Rats

	First Injection		Second Injection	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
$t_{1/2}$ (h)	8.18 \pm 0.77	8.21 \pm 1.01	1.32 \pm 0.62 ^a	0.64 \pm 0.22 ^a
AUC (h-% of dose/mL)	58.4 \pm 6.5	54.2 \pm 10.1	2.65 \pm 0.42 ^a	1.36 \pm 0.10 ^a
CL (mL/h)	1.73 \pm 0.18	1.89 \pm 0.32	38.3 \pm 6.6 ^a	73.8 \pm 5.4 ^a
V_{dss} (mL)	17.7 \pm 3.5	19.5 \pm 3.6	34.9 \pm 13.2 ^a	18.8 \pm 8.0

^a $p < 0.01$ versus first injection. Each value represents the mean \pm SD ($n = 4$).

The data for the first injection are cited from our previously reported paper.¹⁶

$t_{1/2}$, half-life; AUC, area under the concentration-time curve; CL, clearance; V_{dss} , distribution volume.