ペンダント型ポリエチレングリコール 修飾イムノリポソームのターゲティング特性

滝澤知子・丸山一雄・岩鶴素治^{*1)}、佐々木克典^{*2)}

Targetability of the pendant type polyethyleneglycol-immunoliposomes in vivo

Drug delivery to specific cells by immunoliposomes represents a potentially attractive mode of therapy. However, though immunoliposomes are effective in specific binding to target cells *in vitro*, their targeting efficiency *in vivo* is relatively low. We have recently developed a new type of polyethyleneglycol (PEG)-immunoliposomes, so called a pendant type PEG-immunoliposome, which are carrying the monoclonal antibodies at the distal ends of PEG chains. Pendant type PEG-immunoliposomes showed high targetability *in vivo*. In this study, we have synthesized new other PEG derivatives with reactive residues at the distal terminal of PEG chains, i. e., DSPE-PEG-COOH, DPPE-PEG-Mal and DPPE-PEG-CDI. PEG-liposomes composed of ePC/CH (2:1, m/m) and 6 mol% of PEG derivative were prepared and a monoclonal IgG antibody, 34A, which is highly specific to pulmonary endothelial cells, was conjugated to the terminal of PEG-COOH-, PEG-Mal- or PEG-CDI-liposomes. PEG-liposomes without antibodies showed the prolonged circulation time and the reduced RES uptake. All 34A-PEG-immunoliposomes showed high targeting efficiency to the lung in BALB/c mice. This approach provides a simple means of conjugating antibodies or ligands directly, and should contribute to development of superior targetable drug delivery vesicles for use in diagnostics and therapy.

Tomoko Takizawa・Kazuo Maruyama・
Motoharu Iwatsuru^{*1)}, Katsunori Sasaki^{*2)}

key words : liposome, immunoliposome,
polyethyleneglycol, drug delivery system

イムノリポソームは、ターゲティング部位に選択的に薬物を送達可能とする理想的な DDS キャリアである¹⁾。しかしながら、従来のイムノリポソームでは、*in vitro* で標的細胞に高い結合性を示すものの、*in vivo* では細網内皮系組織 (RES) による取り込みが大きく、標的組織へのターゲティング効率は低いとされている。この場合、リポソーム自身が RES に取り込まれやすいのと、抗体の付与がリポソームの RES への取り込みを助長していることが、ターゲティング部位への到達量を低下させている原因である²⁾。

一方、リポソーム表面を両親媒性ポリエチレングリコール (PEG) で修飾すると、RES 取り込みが抑制され、その結果、長時間血中に滞留可能となり、DDS キャリアとして注目されている³⁻⁶⁾。そこで筆者らは、前報において、RES 回避性を有し、より高いターゲティング特性を持つイムノリポソームの開発を目的とし、PEG-リポソームとイムノリポソームとを組み合わせたペンダント型 PEG-イムノリポソームを考案し、生体内ですぐれたターゲティング性を示すことを報告した^{7,8)}。さらに、PEG イムノリポソームにアドリアマイシンを封入する方法として、抗体の活性を損なうことなく高い封入率が得られる硫酸アンモニウム濃度勾配法の適用を報告した⁹⁾。

リポソーム膜表面に配位したポリエチレングリコール鎖は、その表面で自由に運動し水和層を形成することによってオプソニン効果を低減し、その結果、リポソームと RES 細胞との相互作用が低下するため、長時間の血中滞留性が得られると考えられている¹⁰⁾。PEG は、オキシエチレン基が重合した直鎖状のポリマーで、両端を容易に種々の官能基に置き換えることが可能である。前報で

^{*1)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University 帝京大学薬学部薬理学教室

^{*2)} Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine 信州大学医学部解剖学第一講座
Offprint requests to : Tomoko Takizawa, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagami-ko, Tsukui-gun, Kanagawa 199-0195

図 1 Illustration of PEG-immunoliposome and the structure of PEG derivatives

は、PEG の一端にリン脂質を結合して (distearoyl phosphatidylethanolamine-PEG 誘導体, DSPE-PEG) リポソーム膜に固定させ、他端にはカルボキシル基を導入して抗体のアミノ基と結合させ、ペンダント型 PEG イムノリポソームを作成した (図 1 の模式図)。本研究では、PEG の末端をカルボジイミド基またはマレイミド基とした新たな誘導体を合成し、ペンダント型 PEG イムノリポソームの調製にバリエーションを持たせることを目的とした。新規の PEG 誘導体についてリポソームを調製し、マウスにおける血中滞留性および組織分布を調べ、次に PEG 先端に抗体を反応させて PEG イムノリポソームとし、そのターゲティング性について検討した。イムノリポソームを繰り返し投与した場合のターゲティング性の変化についても検討した。

方 法

(1) 試薬・抗体・動物

Egg phosphatidylcholine (ePC), dipalmitoyl

phosphatidylethanolamine (DPPE), distearoyl phosphatidylethanolamine (DSPE), polyethyleneglycol (PEG, 平均分子量 1000), α -Amino polyethyleneglycol (PEG-NH₂, 平均分子量 3000), polyethyleneglycol bis(succinimidyl succinate) (PEG-(OSu)₂, 平均分子量 3000) は日本油脂より供与された。

Cholesterol (CH), Triethylamine, Glutalic acid anhydride は和光純薬より購入した。

1-Ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl) carbodiimide (EDC), N-Hydroxy succinimide (S-NHS), N-Succinimidyl-3-(2-pyridyl dithio) propionate (SPDP), IODO-GEN は Pierce 社より、1, 1'-carbonyldiimidazol (CDI) は MERCK 社より購入した。Succinic anhydride, ϵ -maleimidecaproylsuccinimide (EMCS), dimethyl aminopyridine (DMAP), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), HAuCl₄ · 3H₂O は Sigma 社より購入した。Na¹²⁵I は NEN Japan より購入した。Thyraminyl inulin (TI) は、既報に従って合成

図 2 Biodistribution of PEG-liposomes in BALB/C mice at 3 hr and 6 hr after iv injection

図 3 Scanning electron image(left)and backscatter electron image (right)of 34A-PEG-COOH liposomes treated with gold particle conjugating secondary antibody. Bar=200 nm

し, IODO-GEN 法によって, ^{125}I 標識した¹¹⁾.

モノクローナル抗体には, BALB/c マウスの肺血管内皮細胞表面の gp120 を認識するラットモノクローナル抗体 34A (IgG2a) を用いた¹²⁾. 抗体は, 米国テネシー州オークリッジ国立研究所の S. Kennel 博士より供与された. 34A を IODO-GEN 法により ^{125}I 標識した ($2\sim5\times 10^5$ cpm/ μg). 金粒子標識抗ラット抗体は British Bio Cell International 社より購入した. 実験動物として, BALB/c マウス, 雄性 6~7 週齢を用いた.

(2) PEG 誘導体の合成

末端にカルボキシル基を有する PEG 誘導体 (DSPE-PEG-COOH) は, 前報に従って DSPE と PEG- $(\text{OSi})_2$ から合成した⁷⁾. 末端にマレイミド基を有する PEG 誘導体 (DPPE-PEG-Mal) は, まず PEG- NH_2 と EMCS をクロロホルム中で反応させて得た PEG-Mal と, 別に DPPE と無水コハク酸を DMAP 存在下とクロロホルム中で反応させて得た DPPE-Suc とをクロロホルム中 DCC および DMAP 存在下で反応させて合成した (図 1). 末端にカルボジイミド基を有する PEG 誘導体

図 4 Immunotargetability and biodistribution of 34A-PEG-immunoliposomes in BALB/C mice at 30 min after iv injection. The number in square brackets represents the average number of antibody molecules per liposome.

図 5 Scanning electron image of the ultrastructural localization of 34A-PEG-COOH liposomes binding (arrows) to the lung capillary endothelium. Bar=1 μ m.

(DPPE-PEG-CDI)の合成は、PEGとCDIをクロロホルム中で反応させてPEG-(CDI)₂を得、これとDPPEをクロロホルム中で反応させて行った(図1)。TLC(展開溶媒:CHCl₃:MeOH:H₂O=70:30:5(v/v))によりそれぞれの誘導体の純度を確認し、削り取って精製した。

(3) リポソームの調製

PEG誘導体を含有するPEGリポソームを調製した。この場合、抗体との反応を考慮したbufferを用いて行った。ePC/CH=2/1(m/m)を脂質の基本組成とし、PEG誘導体(DSPE-PEG-

COOH, DPPE-PEG-CDIまたはDPPE-PEG-Mal)を6 mol%の割合で添加し、REV法とextrusion法によりリポソームを調製した。Extrusion法において0.1 μ mの細孔のポリカーボネート膜を用いて、リポソームのサイズを100~130 nmに制御した。

各PEGリポソームへの抗体の結合は次のように行った。PEG-COOHリポソームをMES buffer(pH 5.5)を用いて調製後、EDCおよびS-NHS存在下室温で2時間抗体と反応させた。PEG-MalリポソームはPBS(pH 6.5)を用いて

図 6 Effect of repeat injection on immunotargetability and biodistribution of 34A-PEG-COOH liposomes in BALB/C mice. Mice were already pretreated by the 2 times (1 week interval) injection of 34A-PEG-COOH liposomes.

調製し、SPDP により SH 基を導入した抗体と反応させた。PEG-CDI リポソームは borate buffer (pH 8.5) を用いて調製し、抗体と室温で 2 時間反応させた。それぞれ未反応の抗体は Bio-Gel A-15m カラムにより分離し、PEG イムノリポソームを精製した。

リポソームのサイズは、Nicomp サブミクロン粒度分布計 (Model 370, 野崎産業) で測定した。PEG リポソームの体内分布測定の場合には、 ^{125}I -TI を内封した。

(4) 動物実験

3 種の PEG リポソームをそれぞれ BALB/c マウスに尾静脈投与し、3 時間後および 6 時間後における血中および主要臓器への分布を調べた。また、34A-PEG イムノリポソームのターゲティング性と体内分布の測定は、BALB/c マウスに尾静脈投与し、30 分後における肺への集積性と体内分布を調べた。繰り返し投与による実験には、34A-イムノリポソームを 1 週間間隔で 2 回尾静脈投与したマウスに対して、3 週間目に尾静脈投与して 30 分後における肺への集積性と体内分布を調べた。

(5) 電子顕微鏡による観察¹³⁾

34A-PEG イムノリポソームを金コロイド (粒子径 20 nm) 標識した二次抗体 (抗ラット抗体) と室温で 30 分間インキュベートした。遠心により過

剰の二次抗体を除去したあと、ポリカーボネートメンブラン上に付着させ、1% マラカイトグリーンおよび 1% グルタルアルデヒドを含む PB 溶液 (pH 7.4) および 1% 酸化オスミウムを含む PB 溶液 (pH 7.4) にて固定した。これを走査電子顕微鏡により観察した。また、金コロイド内封リポソームは塩化金溶液 (pH 3.4) を用いて PEG リポソームを調製し、pH を 6 に調整したあと 60°C でインキュベートして得た。その PEG 末端に抗体を結合させて 34A-PEG イムノリポソームを得た。

BALB/c マウスに尾静脈投与後 2 時間において、心臓より 2.5% グルタルアルデヒド溶液を灌流させて固定し、常法により切片を作成して走査電子顕微鏡で観察した。

結果・考察

(1) PEG リポソームの血中滞留性

ePC/CH リポソームの体内分布に対する PEG 誘導体の影響について、PEG 誘導体を脂質に対して 6 mol% の割合で添加した PEG リポソームを調製し、BALB/c マウスで比較検討した。

ePC/CH リポソームおよび 3 種の PEG リポソームの投与後 3 と 6 時間の体内分布結果を図 2 に示す。図から明らかなように、PEG 誘導体の付与によって、いずれのリポソームの血中滞留量は著しく増加し、肝臓による取り込みは低減してい

た。これは、PEGの末端がメトキシシル基(PEG-O-CH₃)となっている従来のPEGリポソームの結果^{3,6)}とほぼ同様であった。血中滞留性において、PEG-COOHリポソームは3種の誘導体の中でもっとも高い値を示し、投与後3時間において投与量の65%、6時間後においても44%滞留していた。肝臓および脾臓への取り込みにおいて、PEG-COOHおよびPEG-CDIリポソームは、従来のPEGリポソームと同様な結果を示したが、PEG-Malリポソームでは、比較的高い値を示した。本結果より、PEGリポソームの血中滞留性は、PEG末端に導入された基により影響されるものの、いずれの場合も高い値を示しその有効性が認められた。

PEGリポソームの血中滞留性化のメカニズムは、水分子を結合したPEG鎖がリポソーム表面に水和層を形成し、血清蛋白、特に補体、の結合を低減するため、RESのマクロファージの認識から回避できるためであると考えられている。この場合、PEG鎖はリポソーム表面上で自由に運動し、その軌跡は傘状となることを、Torchilinらのグループは理論的に計算している¹⁰⁾。PEG鎖による傘状の水和層形成によって、血清タンパクのリポソーム表面への吸着が立体障害的に妨害され、結果としてマクロファージによって取り込まれなくなる。したがって、PEG鎖の自由度(フレキシビリティ)が、PEGリポソームの血中滞留性に重要であり、本実験のPEG誘導体は、いずれもそのフレキシビリティを有してリポソーム膜に組み込まれていると考えられる。

(2) ペンダント型PEGイムノリポソームの調製とターゲティング性

3種のPEG誘導体(PEG-COOH, PEG-Mal, PEG-CDI)を用いてリポソームを調製し、肺血管内皮細胞を標的とする抗体34Aと反応させてペンダント型PEGイムノリポソームを調製した。

PEG-COOHリポソームおよびPEG-CDIリポソームと抗体との反応において、修飾率はそれぞれ21%と29%で、PEG-Malリポソームの場合43%であった。リポソームの平均粒子径を130 nmおよび抗体の分子量を約15万として、Enochら

の方法¹⁴⁾に従ってリポソーム1個当たりの抗体量を計算したところ、PEG-COOHリポソームで24分子、PEG-Malリポソームで121分子、PEG-CDIリポソームで26分子の結果を得た。抗体のアミノ基を利用してPEG末端と結合するPEG-COOHとPEG-CDIと、抗体にあらかじめチオール基を導入して結合するPEG-Malでは、修飾率に大きな差があった。図3は、PEG-COOHリポソーム表面に存在する34Aをゴールドラベルした二次抗体で検出した走査電子顕微鏡写真である。写真から明らかなように、球形状のリポソームが写し出され、その上に金粒子が多数存在し、抗体が結合している様子が確認された。この場合、抗体はPEGの先端に結合していることになる。

次に、これらPEGイムノリポソームのBALB/cマウスにおける体内分布を調べた。結果を図4に示す。34A-PEG-COOHリポソームおよび34A-PEG-CDIリポソームはともに高い肺への集積を示した。これに対し、34A-PEG-Malリポソームでは、多い抗体結合量にもかかわらず、その肺へのターゲティング性は他のPEGイムノリポソームにくらべて低く、33%程度であった。しかしながら、いずれのイムノリポソームも、図2のePC/CHリポソームの肺への集積量にくらべて著しく高い値であり、34Aが活性を損なうことなく、それぞれのPEGの先端に結合していることが示された。図5は、34A-PEG-COOHリポソームに金コロイドを封入し、尾静脈投与2時間後のBALB/cマウス肺血管内腔の走査電子顕微鏡写真である。血管内腔壁に多数の金粒子が認められ、34A-PEG-COOHリポソームがターゲティングして結合している様子が観察された。

34A-PEG-Malリポソームが、多い抗体結合量にもかかわらず、ターゲティング性が比較的低かったのは、肝臓や脾臓への取り込みが増えたためと考えられる。また、図2でも示したように、PEG-Malリポソーム自身が、肝臓・脾臓によって比較的に取り込まれやすいことも影響していると考えられる。本実験で用いたPEGリポソームでは、理論計算からPEG分子が4000から5000分子リポソーム表面を覆っていることになり、ほんの一

部の PEG の先端に 34A が結合していることになり、したがって、PEG リポソーム自身の特性、つまり肝臓・脾臓に取り込まれがたい性質が、抗体を結合した場合にも重要になってくるようだ。さらに、抗体 34A は、肺血管内皮細胞表面を認識するため、PEG 先端に配置することも、そのターゲティング効率に対してきわめて重要である。

PEG-COOH と PEG-CDI では、抗体のアミノ基を利用して結合するが、PEG-COOH では、EDC によるカルボキシル基の活性化が必要であり、活性化段階での内封薬物の分解や不活化が問題となる⁹⁾。これに対して、PEG-CDI ではその必要がなく抗体との反応条件は穏和で容易である。PEG-Mal では、チオール基との反応で、今回は SPDP 法により抗体に SH 基を導入して結合させたが、抗体の Fab' フラグメントなどはそのまま結合可能で有用が高い。

(3) PEG イムノリポソームの繰り返し投与によるターゲティング性の変化

イムノリポソームによる治療を考えた場合、複数回にわたる投与が必要となると考えられるが、この場合、抗体の産生が問題となる。そこで、PEG イムノリポソームを繰り返し投与した場合のターゲティング性について検討した。結果を図 6 に示す。肺へのターゲティング率が約 52%を示す 34A-PEG-COOH リポソームを 1 週間間隔で BALB/c マウスに 2 回投与した。同一マウスに、約 46%の肺へのターゲティング性を示す 34A-PEG-COOH リポソームを投与しターゲティング性の変化を調べた。図 6 から明らかなように、3 回目の投与では肺へのターゲティング性は著しく低下し、肝臓への高い取り込みがみられた。これはイムノリポソームの 2 回前投与 (1 週間隔) によって、抗体が産生され、その結果、3 回目の 34A-PEG-COOH リポソームに対してイムノコンプレックスが形成され肝臓へ分布したものと考えられる。抗抗体の産生は、抗体を用いたターゲティングにおいて、いつも問題となる点で、今後の抗体工学の発展による解決に期待しなければならない。

結 論

3 種 (DSPE-PEG-COOH, DPPE-PEG-Mal, DPPE-PEG-CDI) の末端に反応性基を有する PEG 誘導体を合成した。これらを組み込んだ PEG リポソームは、互いに若干の差はあるものの RES 回避性と血中滞留性を示した。これらリポソームには、抗体の活性を損なうことなくその先端に結合させることができ (ペンダント型)、高いターゲティング特性を得ることができた。種々の抗体やリガンドなど、状況に応じて PEG 末端の反応性基を選択し、PEG リポソームを調製することが可能となった。このように、固形癌組織や感染部位へターゲティング可能なペンダント型 PEG イムノリポソームやプロテオリポソームの調製にバリエーションが増え、今後の応用が期待される。

文 献

- 1) Liposomes from biophysics to therapeutics. (Marc J. Ostro), Marcel dekker, New York, 1987.
- 2) Maruyama K, Holmberg E, Kennel SJ, Klivanov A, Torchilin VP, Huang L: Characterization of in vivo immunoliposome targeting to pulmonary endothelium. *J. Pharm. Sci.* 79: 978-984, 1990.
- 3) Klivanov A, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L: Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 268: 235-237, 1990.
- 4) Allen TM, Chonn A: Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.* 223: 42-46, 1987.
- 5) Blume G, Cevc G: Liposomes for the sustained drug release in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 91-97, 1990.
- 6) Maruyama K, Yuda T, Okamoto S, Kojima S, Suganaka A, Iwatsuru M: Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Biochim. Biophys. Acta* 1128: 44-49, 1992.
- 7) Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M: Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic polyethyleneglycols conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1234: 74-80, 1995.
- 8) 滝澤知子, 丸山一雄, 岩鶴素治: ステルスイムノリポソーム, 抗体-ポリエチレングリコール修飾リポソームの調製とその標的指向性の評価. *DDS* 10: 167-173, 1995.
- 9) 滝澤知子, 丸山一雄, 岩鶴素治: PEG-イムノリポソーム

- ムのターゲティング特性とそのアドリアマイシン封入体の調製. DDS 11 : 405-410, 1996.
- 10) Torchilin VP, Papisov MI : Why do polyethylene glycol-coated liposomes circulation so long? J Liposome Res. 4 : 725-739, 1994.
- 11) Sommerman EP, Pritchard PH, Cullis PR : ¹²⁵I labelled inulin : a convenient marker for deposition of liposomal contents in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 122 : 319-324, 1984.
- 12) Kennel J, Lankford T, Hughes B, Hotchkiss J : Quantitation of a murin lung endothelial cell protein, P112, with a double monoclonal antibody assay. Lab. Invest. 59 : 692-670, 1988.
- 13) Ishii F, Takamura A, Noro S : Observation of liposomes by scanning electron microscope. 7 : 307-308, 1982.
- 14) Enoch HG, Strittmatter P : Formation and properties of 1000-Å-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 145-149, 1979.