

研究报告

反义寡核苷酸 pH 敏前体脂质体的制备及性质分析*

王 弘 王升启¹⁾ 王志清 朱宝珍

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 为了提高反义寡核苷酸的稳定性和生物利用度及避免在溶酶体内降解, 采用旋转蒸发-薄膜水化、超声-挤压、冻干三步法完成 pH 敏前体脂质体的制备, 研究了体外释药规律; 以反义寡核苷酸为实验对象, 测定了包封率。制得的 pH 敏前体脂质体复水后形成的 pH 敏脂质体形态圆整, 粒径 12.3~389.9 nm 范围内, 平均粒径为 22.7 nm; 三批 pH 敏脂质体的平均包封率为 68.3%; 体外释药方程为 $Q = 1.8382 - 2.5186 \times 10^{-2} T$ ($r = 0.9913$); 结果说明制备的 pH 敏前体脂质体水合形成的 pH 敏脂质体粒度适宜, 可用于反义寡核苷酸的包封。

关键词 pH 敏前体脂质体, pH 敏脂质体, 反义寡核苷酸

学科分类号 Q734, R944.9

反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotides, ASODN) 是一种能与特定 DNA 或 RNA 结合并阻断基因表达的生物效应分子。由于反义寡核苷酸具有多价阴离子不被细胞有效摄取, 而且其天然磷酸二酯键易被细胞内外酶系统降解使药效大大降低, 各种化学修饰虽然能够在一定程度上增加反义寡核苷酸的稳定性但仍无法解决细胞内溶酶体内降解的问题^[1]。pH-敏脂质体是一种具有细胞内靶向和控制药物 (如基因、核酸、肽、蛋白质) 释放的功能性脂质体。在酸性条件下, 即在核内体形成后几分钟内, 进入溶酶体之前, pH 从 7.4 减至 5.3~6.3 左右时, pH-敏脂质体膜发生结构改变, 促使脂质体膜与核内体/溶酶体膜的融合, 将包封的物质导入胞浆及主动靶向病变组织, 避免网状内皮系统的清除^[2]。制成 pH 敏脂质体可在一定程度上避免溶酶体降解并增加 ASODN 摄取量、提高 ASODN 的稳定性能、有效地将 ASODN 转运到胞浆^[3~7]。本文以反义寡核苷酸为模型药物, 研究了 pH 敏前体脂质体的制备工艺及包封性质。

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

扫描电子显微镜 (S 505 型, 荷兰 PHILIPS 公司); 透射电子显微镜 (EM400 型, 荷兰 PHILIPS 公司); 分光光度计 (DU 640 型, 美国 BECKMAN 公司); Zeta Plus 型激光散射粒度仪 (美国

BROOKHAVEN 仪器公司); Soniprep 150 型超声波细胞粉碎机 (英国); T8 ANTRIEB 型高速组织匀浆机 (Jank&Kunkei GmbH Co. KG D. 79219 Stanfen, 德国); OP120 旋转蒸发器 (Oligo Prep (Savant 公司, 美国); 注射用大豆磷脂 (Soybean Lecithin, 批号 970901, 上海油脂一厂); 药用大豆磷脂 (Soybean Lecithin, 批号 980301, 沈阳药科大学制药厂); DC-胆固醇 (3 β [N-N', N'-二甲氨基乙基-羧基]-胆固醇, 自制); HZQ-X100 型振荡培养箱, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; 反义寡核苷酸 (A 型流感病毒基因组末端保守序列: 5' CCTTGTTTCTACT3'; 在 Applied Biosystems 391DNA 合成仪合成, 反相柱 (Solid Phase Sciences 公司) 层析法纯化^[8]。

1.2 pH 敏前体脂质体的制备

pH 敏脂质体的制备有反相蒸发法、旋转蒸发-薄膜水化法、超声-挤压法、透析、乳化微流体化法等^[5,7]。本文在此基础上加以改进, 采用旋转蒸发-薄膜水化、超声-挤压、冻干三步法完成 pH 敏前体脂质体的制备。方法: 称取大豆磷脂和 DC-胆固醇溶于一定量的有机溶媒中, 旋转蒸发制膜把缓冲液加入脂膜薄层上水化, 经过振荡、旋涡混合分

* 国家“863”计划资助项目 (102-08-04-01)。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (010) 66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 1999-03-04, 修回日期: 1999-07-13

散水化膜得到混悬液经过超声、挤压均匀, 冻干即得 pH 敏前体脂质体. 考虑到诸多因素对 pH 敏前体脂质体水合后的 pH 敏脂质体形成和质量的影响, 应用正交试验设计, 优选最佳制备工艺条件.

1.3 pH 敏脂质体的粒度分布观察

水合后观察脂质体的形态和粒度, 采用透射电子显微镜观察空白 pH 敏前体脂质体加入反义寡核苷酸溶液后形成的反义寡核苷酸 pH 敏脂质体的外观形态. 选定制备良好脂质体形态和粒度的工艺并且连续观察三种批号.

1.4 反义寡核苷酸的回收率试验

取 60 μ l、80 μ l、100 μ l、120 μ l、140 μ l、160 μ l 和 180 μ l 的反义寡核苷酸溶液 (1.0 g/L), 分别置于 Nanosep OD030C33 离心管中, 12 000 r/min 离心 4 min, 取滤液; 再往上层管中加 200 μ l 蒸馏水, 12 000 r/min 离心, 取洗涤滤液重复此操作 5 次, 将各洗涤滤液分别在 260 nm 处测定吸收值, 然后将滤液及 6 次洗涤滤液吸收值计算的反义寡核苷酸的量.

1.5 pH 敏前体脂质体的包封率测定法

精密称取适量空白 pH 敏前体脂质体, 同反义寡核苷酸溶液定量水合溶解, 得 pH 敏反义寡核苷酸脂质体混悬液, 精密吸取该混悬液, 置于 Nanosep 离心管, 12 000 r/min 离心 5 min, 收取离心液, 再用蒸馏水洗涤上述离心管, 离心 12 000 r/min $\times$ 4 min, 重复 5 次, 分别收取离心洗涤液, 采用紫外分光光度法, 在分光光度计 (DU 640 型, 美国 BECKMAN 公司) 260 nm 波长处测定吸收度, 以换算系数为 33 计算离心液及各洗涤离心液反义寡核苷酸含量为脂质体混悬液中游离反义寡核苷酸的量 (C_f). 反义寡核苷酸的投药量为脂质体混悬液中反义寡核苷酸的总量 (C_0). pH 敏前体脂质体的包封率 = $(1 - C_f / C_0) \times 100\%$.

1.6 包封率测定方法的回收率试验

将适量反义寡核苷酸标准溶液置于 Nanosep 离心管中, 按脂质体包封率方法离心, 洗涤收集各离心液, 测定其中反义寡核苷酸的量, 计算回收率.

在空白 pH 敏前体脂质体中加入等量反义寡核苷酸, 置于 Nanosep 离心管, 加 Triton X-100 (10%), 按包封率测定方法测定各离心液和各洗涤离心液中反义寡核苷酸的总量, 计算回收率.

1.7 pH 敏脂质体体外释药性能考察

将空白 pH 敏前体脂质体与反义寡核苷酸溶液水合形成反义寡核苷酸 pH 敏脂质体, 置于 37 $^{\circ}$ C 条

件下缓慢摇匀, 并在 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 取样, 离心, 测定各时间反义寡核苷酸含量, 释放测定结果数据进行释放动力学分析^[9].

2 结 果

2.1 pH 敏前体脂质体制备条件

脂质体组成为大豆磷脂与 DC-胆固醇摩尔比是 6:4; 沈阳药科大学制药厂生产的大豆磷脂, 所得制剂良好, 包封率高, 水合形成稳定的脂质体. 采用乙醇为溶媒溶解大豆磷脂与 DC-胆固醇, 用旋转蒸发法制膜, 水化脂膜后经超声 10~15 min, 挤压过膜以 100、200、450、800 nm 孔径制备 pH 敏脂质体的粒径较好; 而未经挤压过膜所得水合脂质体粒径分布范围大. 水合后观察脂质体的形态和粒度, 连续观察最优条件制备的三种批号脂质体, 重复性好, 粒度分布均匀, 包封率稳定.

2.2 有机溶媒对 pH 敏前体脂质体水合作用的影响

有机溶媒是 pH 敏前体脂质体制备的关键, 比较氯仿、甲醇、乙醇为溶剂对制剂外观、色泽、水合速度的影响, 结果表明: 以氯仿、甲醇体积比 2:1; 1:1 为有机溶媒制备的 pH 敏前体脂质体, 在水合后电镜下观察可见脂质体粘连, 粒径较大, 粒径分布范围宽, 平均粒径为 690 nm. 在制备过程选用乙醇为溶剂.

2.3 超声时间对脂质体粒径影响

水合后 pH 敏脂质体粒径取决于溶媒和超声时间. 分别用 5、10、15、20、25 min 超声, 均可制得 pH 敏前体脂质体. 其中以 10~15 min 为优, 脂质体混悬均匀, 且易于控制粒径, 表明随超声时间延长脂质体的粒径减小, 见表 1, 但是超声时间过长反而使脂质体聚集不稳定甚至破坏.

表 1 超声时间对水合后 pH 敏脂质体粒径影响

t / min	d / nm
5	1538~615
10	764~107
15	588~17
20	392~12
25	690~10

根据以上考察结果, 选定制备方法、溶媒、大豆磷脂和 DC-胆固醇用量, 以 pH 敏前体脂质体水合时间、水合后 pH 敏脂质体粒径分布、包封率作指标对试验结果进行评价分析, 得到乙醇为旋转蒸

发过程中的溶媒、超声、冻干法制得的 pH 敏前体脂质体, 这种 pH 敏前体脂质体水合后形成 pH 敏脂质体, 形态圆整 (图 1) 规则, 透射电子显微镜观察可见外壁为多层型. 粒径大小分布均匀. 平均粒径: 22.7 nm, 粒径分布在 12.3~389.9 nm 范围内, 粒径为 17.0 nm 的脂质体数目所占体积百分率为 98.51%.

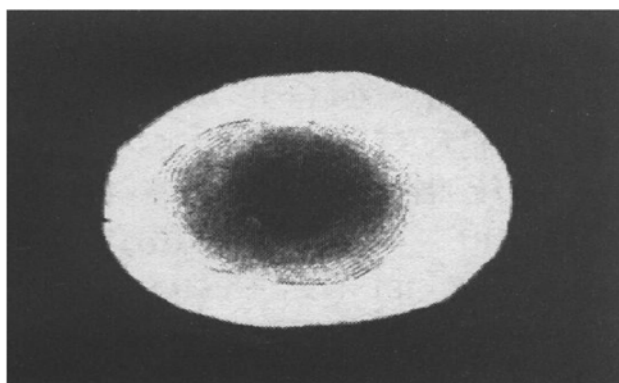


图 1 pH 敏反义寡核苷酸脂质体透射电子显微镜照片

放大倍数: $\times 100000$.

2.4 反义寡核苷酸的回收率

在 6 个浓度水平上测定了反义寡核苷酸的回收率, 结果见表 2, 表明反义寡核苷酸的测定回收率范围是 100.1%~100.7%.

表 2 反义寡核苷酸的回收率 (260 nm)

加入量 / μg	实测量 / μg	n	回收率 / $\%$	RSD / $\%$
60	160.433 ± 0.666	3	100.7	1.102
80	80.533 ± 0.643	3	100.7	0.798
100	100.567 ± 0.709	3	100.6	0.705
120	120.267 ± 0.569	3	100.2	0.473
140	140.100 ± 1.229	3	100.1	0.877
160	160.200 ± 1.114	3	100.1	0.695

2.5 pH 敏前体脂质体的包封率和回收率

测定三批样品 (批号 98051102、980603、980625) 包封率分别为 $68.5\% \pm 1.22\%$, $68.6\% \pm 1.90\%$, $67.8\% \pm 1.27\%$; 平均包封率: 68.3%, 精密度分别为 1.78%, 2.77%, 1.87%.

本法对反义寡核苷酸标准溶液测定, 平均回收率 = 99.68%, $SD = \pm 0.75\%$, $RSD = 0.753\%$, $n = 6$.

测定形成的反义寡核苷酸 pH 敏脂质体中反义寡核苷酸的量, 平均回收率 = 99.63%, $SD = \pm 0.648\%$, $RSD = 0.65\%$, $n = 6$.

2.6 pH 敏脂质体体外释药性能

反义寡核苷酸 pH 敏脂质体中药物释放测定实验结果表明, 反义寡核苷酸累积释放百分率符合单指数方程, 即: $Q = 1.8382 - 2.5186 \times 10^{-2} T$ ($r = 0.9913$) (图 2), 最初 30 min 释药达 30.08%, 24 h pH 敏脂质体累积释药为 82.01%.

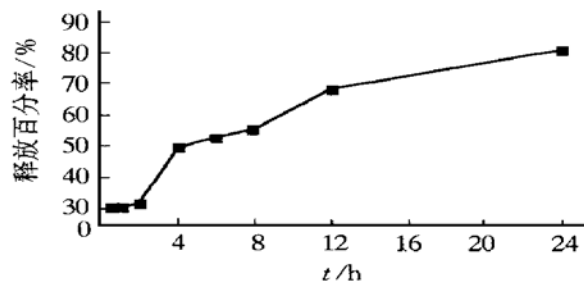


图 2 pH 敏反义寡核苷酸脂质体中反义寡核苷酸的体外释放

3 讨 论

脂质体由大豆磷脂和 DG-胆固醇制成. 大豆磷脂的组分是影响包封率的主要因素, 实验显示沈阳药科大学制药厂生产的大豆磷脂对反义寡核苷酸的包封率较高. DG-胆固醇是两亲性分子, 对于 pH 敏脂质体膜是非常重要的成分, 它提高脂膜的机械性质并且改善膜的 pH 敏性质和膜的相行为特性.

用旋转蒸发-超声-冻干法制备 pH 敏前体脂质体时影响因素较多, 其中 pH 值是一个重要因素, 若 pH 值低于 5 或 pH 值高于 9 无论脂质体组成如何, 都不能形成稳定的 pH 敏前体脂质体. 推测原因是制备过程中 H^+ 浓度影响脂质体膜的性质. 挤压过膜的膜孔径对水合成 pH 敏脂质体粒径也有影响, 分别用 100、200、450、800、1000、2000 nm 孔径的微孔滤膜制备 pH 敏脂质体, 其中以 100、200、450、800 nm 孔径制备 pH 敏脂质体的粒径较好.

挤压过膜的膜孔径对水合成 pH 敏脂质体粒径也有影响, 分别用 100、200、450、800、1000、2000 nm 孔径的微孔滤膜制备 pH 敏脂质体, 其中以 100、200、450、800 nm 孔径制备 pH 敏脂质体的粒径较好.

脂质体粒径通常控制在 100 nm, 包封率较低仅为 1%^[10]. 为提高包封率, 新研制的 pH 敏前体脂质体是溶解时在反义寡核苷酸周围形成脂质体而不是强迫反义寡核苷酸进入脂质体. 这一策略是在形成脂质体时将反义寡核苷酸与脂类结合, 并结合于脂双层内部的脂类部分, 用过量的脂质包围在外

部。以透射电子显微镜观察并摄像, 显示形成的反义寡核苷酸 pH 敏脂质体为多复层脂质体, 提示这一策略的可行性, 此法将反义寡核苷酸包入脂质体中, 获得包封率较高可达 60% ~ 80%。

本文所建立的测定反义寡核苷酸 pH 敏脂质体的含量及包封率的紫外分光光度法简便、快速; 而且用 Nanosep 离心管进行高速离心适宜对蛋白质、DNA、RNA 及反义寡核苷酸物质的检测, 为进一步的制剂学、生物学测定提供了参考。

通过反义寡核苷酸 pH 敏脂质体混悬液体外释放试验, 发现释放符合一级动力学方程, 并且在 37 °C 时, 释药半衰期为 11.95 h, 说明水合后的反义寡核苷酸从脂质体中释放缓慢。可见, 水合形成的反义寡核苷酸 pH 敏脂质体在 37 °C 时较稳定, 可为体内应用提供依据。

本实验制备的 pH 敏前体脂质体冻干品中不含任何药物, 它与反义寡核苷酸 (抗流感病毒) 的抗病毒效果另文发表, 它适应于不同类型的样品如基因等 (另文发表)。

本研究将 pH 敏前体脂质体冻干品与反义寡核苷酸冻干品分别包装, 然后用反义寡核苷酸溶解液将 pH 敏前体脂质体水合制成反义寡核苷酸 pH 敏脂质体混悬液, 在制备上是可行的, 运输、贮存方便。临用前调配, 稳定性得以提高。由于调配的 pH 敏脂质体粒径较小, 易于细胞吞噬后与溶酶体融合, 释放反义寡核苷酸发挥阻断基因表达的生物效应。

参 考 文 献

- 1 王升启. 反义寡核苷酸的化学修饰. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22 (6): 506~ 511
Wang S Q. Prog Biochem Biophys. Prog Biochem Biophys, 1995, 22 (6): 506~ 511
- 2 Chu C J, Dijkstra J, Lai M Z, *et al.* Efficiency of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in culture. Pharmaceutical Research, 1990, 7 (8): 824~ 834
- 3 Juliano R L, Akhtar S. Liposome as a drug delivery system for antisense oligonucleotides. Antisense Research and Development, 1992, 2: 165~ 176
- 4 Ropert C, Lavignon M, Dubernet C, *et al.* Oligonucleotides encapsulated in pH sensitive liposomes are efficient toward friend retrovirus. Biochem Biophys Res Comm, 1992, 183 (2): 879~ 885
- 5 Ropert C, Malvy C, Couvreur P. Inhibition of the friend retrovirus by antisense oligonucleotide encapsulated in liposome: mechanism of action. Pharm Res, 1993, 10 (10): 1427~ 1433
- 6 Tari A M, Tucker S D, Deisseroth A, *et al.* Liposome delivery of methyphosphonate antisense oligodeoxynucleotide in chronic myelogenous leukemia. Blood, 1994, 84 (2): 601~ 607
- 7 Ma D D F, Wei A Q. Enhanced delivery of synthetic oligonucleotides to human leukaemic cells by liposomes and immunoliposomes. Leukemia Research, 1996, 20 (11/12): 925 ~ 930
- 8 陈忠斌, 王升启, 朱宝珍, 等. 硫代反义寡核苷酸在细胞培养内抗甲型流感病毒活性. 病毒学报, 1998, 14 (3): 193~ 198
Chen Z B, Wang S Q, Zhu B Z, *et al.* Chin J Virol, 1998, 14 (3): 193~ 198
- 9 奚念朱主编. 药剂学. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 454~ 455
Xi N Z. Pharmaceutics. Beijing: Publisher of the People Sanitation, 1994. 454~ 455
- 10 Chonn A, Cullis P R. Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 30 (1, 3): 73~ 83

Preparation of pH Sensitive Preliposomes and the Application in Encapsulation of Antisense Oligodeoxynucleotides. WANG Hong, WANG Sheng-Qi, WANG Zhi-Qing, ZHU Bao-Zhen (Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China).

Abstract To increase the stability and bioavailability of antisense oligodeoxynucleotides, and to avoid being destroyed by the lysosomes, pH-sensitive preliposomes were prepared by using of dehydration-rehydration, ultrasonication, extrusion, lyophilization methods. The effects of different variables on the preparation of pH-sensitive preliposomes were studied. The optimized preparation conditions of pH-sensitive preliposomes were acquired through orthogonal test. The experiment revealed that the pH-sensitive liposome was regular in its morphology with a mean diameter of 22.7 nm. The mean entrapment efficiency of antisense oligodeoxynucleotides of three batches was 68.3%. The release properties could be expressed by the following equation: $Q = 1.8382 - 2.5186 \times 10^{-2} T$ ($r = 0.9913$). Based upon the various assays used to measure the entrapment efficiency and diameter of pH-sensitive liposomes, it was concluded that the entrapment of antisense oligodeoxynucleotides by pH-sensitive preliposomes was effective.

Key words pH-sensitive preliposomes, pH-sensitive liposomes, antisense oligodeoxynucleotides