

可剪切聚乙二醇及TAT肽共修饰多柔比星脂质体的制备及表征^Δ

朱亚勤^{1*},李玲¹,胡青¹,黄发珍¹,程亮¹,程丽芳¹,陈大为^{1,2#}(1.苏州大学药学院,江苏苏州 215123;2.沈阳药科大学,沈阳 110016)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)29-2738-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.29.19

摘要 目的:制备可剪切聚乙二醇(PEG)及TAT肽共修饰多柔比星脂质体(C-TAT-DOX-LP)并对其表征。方法:合成膜材二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-二硫键-聚乙二醇5000(DSPE-S-S-PEG5000)、二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-TAT(DSPE-PEG2000-TAT),采用薄层色谱(TLC)、红外光谱(IR)、核磁共振(¹H-NMR)等分别对合成产物进行表征,高效液相色谱法测定TAT肽连接率。采用pH梯度法制备DOX脂质体(DOX-LP),后插入法制备C-TAT-DOX-LP,考察其粒径、Zeta电位、形态、包封率,进行体外可剪切试验考察粒径及Zeta电位的变化,并考察48h的体外释放情况。结果:成功合成并表征了DSPE-S-S-PEG5000及DSPE-PEG2000-TAT,TAT肽连接率为96.3%。所制备的C-TAT-DOX-LP平均粒径为152.1nm,Zeta电位为-5.4mV,包封率为91.8%。所得脂质体分布均匀且呈球形。经二巯苏糖醇(DTT)作用,C-TAT-DOX-LP的粒径从155.1nm降低至140.5nm,电位由-5.9mV上升至7.8mV,二硫键被还原断裂。48h的体外累积释放度约为40%,PEG剪切后有利于DOX的释放。结论:成功制备了C-TAT-DOX-LP,且其具有一定的缓释性。

关键词 可剪切聚乙二醇;TAT肽;多柔比星;脂质体;制备;表征

Preparation and Characterization of Cleavable PEG and TAT Peptide Co-modified Doxorubicin Liposomes

ZHU Ya-qin¹, LI Ling¹, HU Qing¹, HUANG Fa-zhen¹, CHENG Liang¹, CHENG Li-fang¹, CHEN Da-wei^{1,2} (1.School of Pharmacy, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China; 2.Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare and characterize the cleavable PEG and TAT peptide co-modified doxorubicin liposomes (C-TAT-DOX-LP). METHODS: DSPE-S-S-PEG5000 and DSPE-PEG2000-TAT were synthesized and characterized by TLC, IR, and ¹H-NMR. Interconnection rate of TAT peptide was determined by HPLC. DOX-LP was prepared by pH gradient method, C-TAT-DOX-LP was prepared by post-insertion method. Particle sizes, Zeta potential, morphology, encapsulation efficiency and the *in vitro* release rate within 48 h of DOX from C-TAT-DOX-LP were investigated. RESULTS: DSPE-S-S-PEG5000 and DSPE-PEG2000-TAT were successfully synthesized and characterized, and interconnection rate of TAT peptide was 96.3%. Mean particle size of C-TAT-DOX-LP was 152.1 nm and encapsulation efficiency was 91.8%, Zeta potential was -5.4 mV. Prepared liposomes were well-distributed and regularly spherical in shape. By DTT reaction, the particle size of C-TAT-DOX-LP decreased from 155.1 nm to 140.5 nm, while Zeta potential increased from -5.9 mV to 7.8 mV, the disulfide bonds were cleaved. Accumulative release rate of DOX from C-TAT-DOX-LP was 40% within 48 h, and was relatively enhanced after PEG was cleaved. CONCLUSIONS: C-TAT-DOX-LP is successfully prepared, showing certain sustained-release property.

KEY WORDS Cleavable PEG; TAT peptide; Doxorubicin; Liposomes; Preparation; Characterization

多柔比星(DOX)是临床常用的广谱抗肿瘤药物,但是它的毒副作用如骨髓抑制、心脏毒性等限制了其临床应用^[1]。脂质体作为一种新型给药系统,具有不良反应小、无免疫原性和可生物降解等优点。将DOX包裹入脂质体可显著降低药物毒性,改善药物抗肿瘤效果^[2]。

TAT肽是一种细胞穿膜肽^[3],其有效序列为AYGRK-KRRQRRR,在生理pH下带正电荷。研究表明,TAT肽可显著提高脂质体、胶束等的细胞摄取^[4],增强化疗药物的抗肿瘤效

果。然而,TAT肽无细胞选择性,直接与纳米载体相连后会降低纳米载体在体内的肿瘤靶向性。本研究将可剪切的聚乙二醇(PEG)5000连接在脂质体表面,TAT肽通过PEG2000连接隐藏在内层,构建可剪切PEG及TAT肽共修饰DOX脂质体(C-TAT-DOX-LP),并对其表征。

1 材料

RV10旋转蒸发仪(德国IKA公司);Nicomp TM380 ZLS粒径分析仪(美国Nicomp公司);DeBEE高压微射流纳米均质机(美国Nano DeBEE公司);SPD-M20A高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

盐酸DOX(原料药,北京华奉联博科技技术有限公司,批号:HF100622,纯度:>99.5%);二硬脂酸磷脂酰乙醇胺(DSPE,上海艾伟特医药科技有限公司,批号:100929,纯度:≥99%);

^Δ 大学生创新性实验计划资助项目(No.11cxsj070)

* 硕士研究生。研究方向:药剂学。E-mail: zhuyaqinaili@163.com

通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:药剂学。电话:0512-65884729。E-mail: chendawei@syphu.edu.cn

大豆卵磷脂(上海太伟药业有限公司,批号:040403,纯度:96%);胆固醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20101215,纯度:95%);TAT-半胱氨酸(TAT-Cys,上海吉尔生化有限公司,批号:P120322-CQ289039,纯度:98%);*N*-羧基丁二酰亚胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺(NHS-PEG2000-Mal,北京键凯科技有限公司,批号:ZZ112P038,纯度:95%);*N*-琥珀酰-3-2-联巯基吡啶-丙酸盐(SPDP,圣克鲁斯生物技术上海有限公司,批号:A1912,纯度:95%);甲氧基-聚乙二醇5000-巯基(CH₃O-PEG5000-SH,上海炎怡生物有限公司,批号:B120628,纯度:≥95%);二巯苏糖醇(DTT,上海前尘生物科技有限公司,批号:233155,纯度:≥99.5%);透析袋(分子质量:8 000~14 000,上海源叶生物科技有限公司);氯仿为分析纯,乙腈、三氟乙酸为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-二硫键-聚乙二醇5000(DSPE-S-S-PEG5000)的合成与表征

2.1.1 DSPE-S-S-PEG5000的合成。根据参考文献^[5],DSPE-S-S-PEG5000的合成步骤如下:称取20 mg DSPE、8.2 mg SPDP溶于无水氯仿中,加入适量三乙胺,N₂保护,室温黑暗下搅拌反应5 h。薄层色谱(TLC)监测反应进程。将80 mg CH₃O-PEG5000-SH溶解于氯仿反应液,继续反应12 h,反应结束后,冷乙腈中沉淀除去未反应的DSPE。3 000 r/min离心5 min,上清液旋转蒸发除去乙腈,加纯水置透析袋中透析48 h,冻干。

2.1.2 DSPE-S-S-PEG5000的核磁氢谱(¹H-NMR)表征。¹H-NMR(溶剂:氘代氯仿)表征,DSPE:δ 0.88(t,—CH₃,6H),1.25(s,—CH₂—,56H),PEG:3.65(s,—CH₂—,456H),见图1。

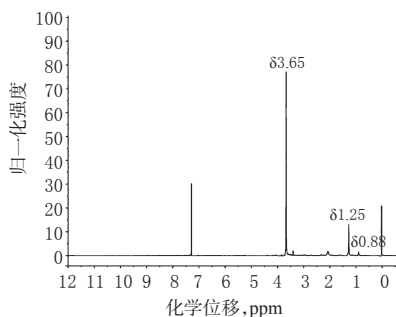


图1 DSPE-S-S-PEG5000的¹H-NMR图

Fig 1 ¹H-NMR spectrum of DSPE-S-S-PEG5000

以上特征峰表明PEG5000成功连接到了DSPE上。以83.65与δ1.25处峰面积比计算产物纯度,结果产物纯度约为84.4%。

2.2 DSPE-PEG2000-TAT的合成与表征

2.2.1 DSPE-PEG2000-TAT的合成。根据参考文献^[6],DSPE-PEG2000-TAT的合成方法如下:按物质的量之比1.2:1称取DSPE、NHS-PEG2000-Mal溶于无水氯仿中,滴加5 μl三乙胺,N₂保护,室温反应5 h。TLC监测反应进程。反应结束后,旋转蒸发除去氯仿,冷乙腈沉淀DSPE,上清液旋转蒸发除乙腈。产物透析48 h,冷冻干燥。按物质的量之比1:1.2称取DSPE-PEG2000-Mal、TAT-Cys,溶于纯水,N₂保护下,轻微搅拌。TLC监测反应进程。反应结束后置透析袋中透析48 h,冷冻干燥。

2.2.2 DSPE-PEG2000-TAT的红外光谱(IR)表征。分别取适量TAT-Cys、DSPE-PEG2000-Mal、DSPE-PEG2000-TAT,加KBr压片,IR表征见图2。

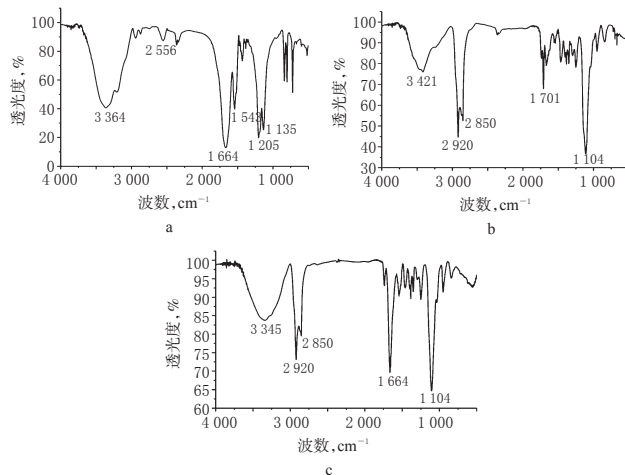


图2 红外光谱图

a.TAT-Cys;b.DSPE-PEG2000-Mal;c.DSPE-PEG2000-TAT

Fig 2 FTIR spectrums

a. TAT-Cys; b. DSPE-PEG2000-Mal; c. DSPE-PEG2000-TAT

其中,a图中 $2\ 556\ \text{cm}^{-1}$ 为TAT-Cys中巯基(—SH)的特征吸收峰,在c图中该吸收峰消失,b图中在此位置无吸收峰干扰,证明TAT肽中—SH与DSPE-PEG2000-Mal中的Mal基团已成功连接。b、c图中 $2\ 920\ \text{cm}^{-1}$ 、 $2\ 850\ \text{cm}^{-1}$ 为PEG中C—H伸缩振动, $1\ 104\ \text{cm}^{-1}$ 为PEG中C—O伸缩振动,a、c图中 $1\ 664\ \text{cm}^{-1}$ 为TAT肽中酰胺键C—O伸缩振动,表明已成功合成DSPE-PEG2000-TAT。

2.3 TAT肽连接率的测定

2.3.1 TAT肽含量测定色谱条件。色谱柱:Promosil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:A(乙腈+0.1%三氟乙酸)-B(水+0.1%三氟乙酸),梯度洗脱:0~12 min,A:12%~37%,B:63%~88%,12~16 min,A:37%~100%,B:0~63%;流速:1.0 ml/min;检测波长:220 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.3.2 方法学考察。依法进行精密度和回收率试验。结果低、中、高水平的日内精密RSD分别为0.30%、0.67%、0.58%(n=5),日间精密RSD分别为1.56%、1.23%、1.31%(n=5);回收率分别为(98.68±0.23)%、(99.49±0.21)%、(99.40±0.43)%,RSD分别为0.62%、0.71%、0.75%(n=5)。

2.3.3 测定方法。反应前精密称取TAT-Cys,配制成100 μg/ml的溶液,按“2.3.1”项色谱条件进样20 μl,记录峰面积为A₁;反应后取适量反应液稀释后按相同色谱条件进样,记录峰面积为A₂,色谱见图3。

由图3可见,DSPE-PEG2000-Mal在此条件下对TAT肽无干扰。根据外标一点法计算未反应的TAT肽的量 $[(100 \times A_2 \times \text{稀释倍数} \times \text{反应液体积})/A_1]$,进一步计算得到TAT肽的连接率 $[(\text{反应前TAT肽的量} - \text{反应后TAT肽的量})/\text{TAT肽理论反应量} \times 100\%]$,经计算为96.3%。

2.4 脂质体的制备

采用薄膜分散法及pH梯度法制备DOX脂质体(DOX-LP),以后插入法^[7]制备TAT肽修饰的DOX-LP(TAT-DOX-LP)、C-TAT-DOX-LP。方法如下:称取适量大豆卵磷脂、胆固醇溶于无水乙醇,旋转蒸发成膜。加入pH 4的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,40 ℃水化20 min。所得的脂质体进行超声粉碎(100 W,400 s),经高压微射流处理(20 000 psi,5 min)后得空白脂

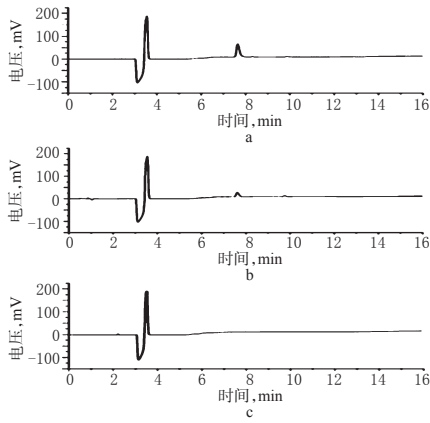


图3 TAT肽的HPLC色谱图

a. 反应前TAT肽; b. 反应后TAT肽; c. DSPE-PEG2000-Mal

Fig 3 HPLC chromatograms of TAT peptide

a. TAT peptide before reaction; b. TAT peptide after reaction; c. DSPE-PEG2000-Mal

质体(Blank-LP)溶液。取Blank-LP溶液适量,用0.1 mol/L的 Na_2HPO_4 溶液调pH至7.6。按药脂比1:15称取DOX溶于pH 7.6的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中,将其缓慢滴加到Blank-LP溶液中,70℃水浴30 min后,立即冷却,即得DOX-LP,未密封的DOX以透析法除去。取DSPE-S-S-PEG5000、DSPE-PEG2000-TAT各适量溶于pH 7.6的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中形成胶束溶液,按物质的量之比分别吸取适量胶束溶液滴入DOX-LP中,55℃条件下水浴1 h,冷却后即得到C-TAT-DOX-LP,以同样方法制备TAT-DOX-LP。

2.5 粒径及Zeta电位的测定

取Blank-LP、DOX-LP、TAT-DOX-LP及C-TAT-DOX-LP各适量,蒸馏水稀释后用粒径分析仪测定粒径及电位。结果,所得脂质体粒径均在200 nm以下,除TAT-DOX-LP带正电外,其他类型脂质体均带负电,见表1。

表1 不同脂质体粒径、电位、包封率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Particle size, Zeta-potential and encapsulation efficiency of different liposomes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

脂质体类型	粒径, nm	Zeta 电位, mV	包封率, %
Blank-LP	108.2 ± 2.4	-8.6 ± 0.5	0
DOX-LP	116.4 ± 1.4	-14.4 ± 0.7	93.5 ± 0.8
TAT-DOX-LP	122.1 ± 2.3	8.4 ± 0.4	92.1 ± 1.3
C-TAT-DOX-LP	152.1 ± 1.2	-5.4 ± 0.3	91.8 ± 1.5

2.6 透射电镜(TEM)形态观察

取DOX-LP及C-TAT-DOX-LP适量,滴加至专用铜网上,样品干燥后进行TEM扫描,结果见图4。

由此可见二者在形态上无明显差别,分布均匀且呈球形。

2.7 包封率的测定

2.7.1 色谱条件。色谱柱:Promosil C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:水(含0.01 mol/L磷酸二氢胺)-甲醇(35:65);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;检测波长:497 nm;进样量:20 μl 。

2.7.2 方法学考察。依法进行精密度和回收率试验。结果低、中、高水平的日内精密度RSD分别为0.43%、0.41%、0.32% ($n=5$),日间精密度RSD为0.62%、0.78%、0.58% ($n=5$);回收率分别为(98.75 ± 0.52)%、(98.82 ± 0.31)%、(100.04 ±

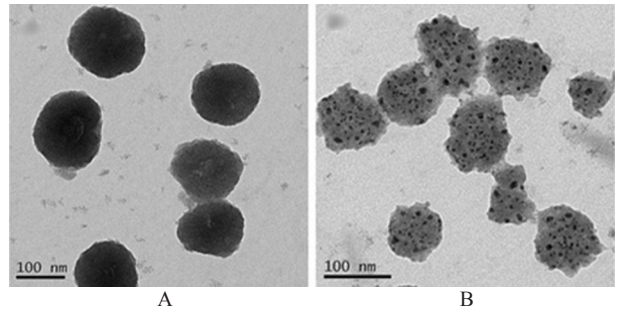


图4 2种脂质体的TEM图

A. DOX-LP; B. C-TAT-DOX-LP

Fig 4 TEM micrograph of 2 kinds of liposomes

A. DOX-LP; B. C-TAT-DOX-LP

0.52)% , RSD分别为0.52%、0.81%、0.63% ($n=5$)。

线性关系考察。标准溶液的制备:精密称取盐酸DOX适量,配成1.0 mg/ml的母液,然后分别配成1、5、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液。按“2.7.1”项下色谱条件进样,以峰面积(A)对质量浓度(c)进行回归,得标准曲线方程 $A=12\ 129.4c-1\ 064.5$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,DOX的检测质量浓度在1~40 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

2.7.3 包封率(Entrapment efficiency, EE)测定。采用超滤离心法测定脂质体的包封率。分别取“2.4”项下脂质体溶液各0.5 ml,置于10 KD超滤离心管中,12 000 r/min离心60 min。将滤液适当稀释,过滤后取20 μl 进样,按“2.7.1”项下色谱条件测定外水相中游离药物的含量。按以下公式计算脂质体的包封率。包封率=(投入的总药量-游离的药量)/投入的总药量×100%。结果所测脂质体的包封率均>90%,见表1。

2.8 体外可剪切试验

取适量TAT-DOX-LP及C-TAT-DOX-LP,分别测定其粒径及电位;加入还原剂二硫苏糖醇(DTT, 10 mmol/L)后,同时在37℃水浴中孵育30 min,再次测定二者粒径及电位[DTT(-)表示不加DTT,DTT(+)表示加DTT],结果见表2。

表2 不同脂质体体外剪切后粒径及Zeta电位测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Particle size and Zeta-potential of different liposomes after cleaved *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

脂质体类型	粒径, nm		Zeta 电位, mV	
	DTT(-)	DTT(+)	DTT(-)	DTT(+)
TAT-DOX-LP	120.8 ± 2.3	122.1 ± 1.2	8.4 ± 0.5	8.1 ± 0.3
C-TAT-DOX-LP	155.1 ± 2.8	140.5 ± 3.7	-5.9 ± 0.8	7.8 ± 0.6

孵育30 min后,TAT-DOX-LP粒径及电位均无明显变化,说明DTT本身对粒径及电位无显著影响;而C-TAT-DOX-LP的粒径从155.1 nm降低至140.5 nm,电位由-5.9 mV上升至7.8 mV,证实了二硫键可在DTT作用下被还原断裂,暴露出TAT肽。

2.9 体外释放试验

分别取C-TAT-DOX-LP、剪切后C-TAT-DOX-LP(即TAT-DOX-LP)、盐酸DOX溶液各5 ml(DOX质量浓度均为5 mg/ml)于透析袋中,两端扎紧后,投入装有50 ml pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(PBS)的三角瓶中,于(37 ± 0.5)℃的恒温水平

振荡,频率为100次/min。分别于0.5、1、2、4、6、8、10、12、16、24、36、48 h取样1 ml,同时补充等体积的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液。收集样品按“2.7.1”项下色谱条件测定,计算累积释放度,绘制释放曲线,见图5。

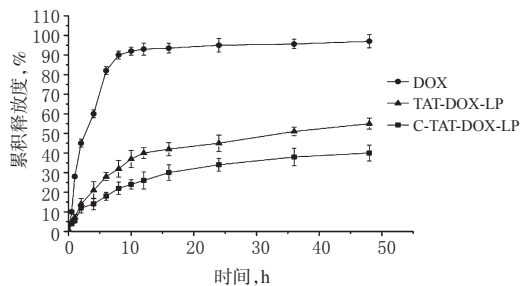


图5 DOX、C-TAT-DOX-LP及TAT-DOX-LP的体外释放曲线

Fig 5 Accumulative release curves of DOX, C-TAT-DOX-LP and TAT-DOX-LP in vitro

由图5可见,游离DOX在8 h时释放已达到90%,10 h时几乎已释放完全;而C-TAT-DOX-LP及TAT-DOX-LP均释放缓慢持续,无突释点。对比2组脂质体,TAT-DOX-LP释放DOX有所增加,说明PEG被剪切后有利于DOX的释放。

3 讨论

本研究旨在制备C-TAT-DOX-LP。该脂质体外层的PEG5000可起到长循环作用,同时掩蔽TAT肽;在肿瘤组织的还原环境中,DSPE-S-S-PEG5000中的二硫键被还原断裂,暴露出内层的TAT肽,从而促进DOX-LP入胞,增强其抗肿瘤效果。合成部分,采用¹H-NMR对DSPE-S-S-PEG5000进行表征,根据DSPE及PEG的特征质子峰鉴定其结构,并通过二者峰面积比计算其纯度;采用高效液相色谱法检测TAT肽连接率。结果表明,本研究所采用的合成方法简单易行且具有较高的反应效率。制备部分,采用经典的pH梯度法制备了高EE的DOX-LP,后插入法制备了C-TAT-DOX-LP。后插入法相较于传统方法简便、节省膜材且对EE无明显影响。体外试验用浓度为10 mmol/L的DTT来模拟肿瘤组织的还原环境,通过测

定C-TAT-DOX-LP粒径及电位的变化来考察其能否在肿瘤微环境下暴露TAT肽。结果显示,C-TAT-DOX-LP在DTT作用下电荷由负变正,与TAT-DOX-LP的电位较接近,证明C-TAT-DOX-LP能够暴露TAT肽,达到了试验设计的目的。体外释放试验表明,所制备的C-TAT-DOX-LP有明显缓释效果,PEG剪切后有利于DOX的释放。

综上所述,本研究成功制备了粒径均一、包封率高的C-TAT-DOX-LP,为下一步考察其抗肿瘤效果奠定了基础。

参考文献

- [1] 樊秋平,梁嘉碧,杨海云,等.热疗用多柔比星温敏纳米粒的制备及工艺优化[J].中国药房,2011,22(17):1580.
- [2] Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2010, 62(2):90.
- [3] Qin Y, Chen H, Zhang Q, et al. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals[J]. *Int J Pharm*, 2011, 420(2):304.
- [4] Torchilin VP. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(4/5):548.
- [5] McNeeley KM, Karathanasis E, Annapragada AV, et al. Masking and triggered unmasking of targeting ligands on nanocarriers to improve drug delivery to brain tumors[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(23/24):3986.
- [6] Kuai R, Yuan W, Qin Y, et al. Efficient delivery of payload into tumor cells in a controlled manner by TAT and thiolytic cleavable PEG co-modified liposomes[J]. *Mol Pharm*, 2010, 7(5):1816.
- [7] Saul JM, Annapragada A, Natarajan JV, et al. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro[J]. *J Control Release*, 2003, 92(1/2):49.

(收稿日期:2012-10-10 修回日期:2012-11-23)

国家食品药品监督管理局党组书记、局长张勇赴国家药典委员会和药品认证管理中心调研

本刊讯 2013年6月24日,国家食品药品监督管理局党组书记、局长张勇赴国家药典委员会(以下简称“药典委”)和药品认证管理中心调研。他先后参观了药品标准档案资料室和计算机房,到药典委和药品认证中心部分业务处室看望干部职工,并亲切交谈,认真听取大家对工作和改革的意见。

张勇局长对药典委和药品认证中心的全体干部职工在人员少、任务重、困难多、专业技术要求高的情况下为药品监管工作所做的努力,给予了充分肯定。他指出,药典委是总局的重要技术支撑单位,药品标准是药品研究、生产、经营、使用及监督管理等各环节必须共同遵守的技术准则和法定依据,在

药品监督管理工作中有着重要的作用。药典委要适应新的形势需要,进一步加强和改进药品标准工作、提高工作效率和水平。他强调,药品认证管理工作专业性强、技术含量高、直接为人民群众健康服务,要十分重视和做好认证检查工作。要创新管理方式,加强干部队伍建设,改进工作作风,培养和打造一支德才兼备的干部职工队伍。

调研中,张勇局长还就开展好党的群众路线教育实践活动提出了明确要求。

总局党组成员、食品药品安全总监吴浈及总局相关司局负责人参加了调研。