

## HV12p-rPA 血栓靶向脂质体的制备及体内溶栓实验

邓璇<sup>1</sup>, 梁兰<sup>1</sup>, 高漫滢<sup>1</sup>, 康丽梅<sup>1</sup>, 余蓉<sup>1\*</sup>, 苏志国<sup>2</sup>, 吴梧桐<sup>3</sup>

(1. 四川大学 华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 中国科学院 过程工程研究所, 北京 100190;  
3. 中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

**摘要** 将通过蛋白质工程获得的抗凝溶栓双功能蛋白水蛭素 12 肽-瑞替普酶(HV12p-rPA)制备成靶向脂质体,并考察其体内溶栓效果。用薄膜分散-超声法制备 HV12p-rPA 脂质体,通过正交设计优化处方,采用碳二亚胺法偶联抗纤维蛋白原单克隆抗体(McAbSZ-65)制备 HV12p-rPA 靶向脂质体,采用大鼠颈总动脉血栓模型,考察 HV12p-rPA 靶向脂质体的体内溶栓效果。结果:最佳处方中 HV12p-rPA 脂质体的粒径为(142.45±1.20) nm, Zeta 电位为(-30.63±0.48) mV, 平均包封率为(91.59±1.39)%。靶向脂质体组(0.48±0.083) mg 在相同剂量下(80k IU/kg)与 PBS 空白对照组(2.04±0.114) mg、游离 HV12p-rPA 组(1.2±0.100) mg 和普通 HV12p-rPA 脂质体组(0.74±0.089) mg 分别比较,其血栓干重明显减轻( $P<0.05$ );靶向脂质体组与 5 倍剂量(400k IU/kg)的游离 HV12p-rPA 组(0.52±0.084) mg 比较,其血栓干重较之偏轻( $P>0.05$ )。制备出的靶向 HV12p-rPA 脂质体具有体内靶向溶栓效果。

**关键词:** 水蛭素 12 肽-瑞替普酶;脂质体;靶向溶栓;颈总动脉血栓模型

**中图分类号** Q54;R965

**文献标志码** A

**文章编号** 1005-8915(2011)03-0215-05

近年来采用蛋白质工程技术将溶栓药物与抗凝剂连接成既具溶栓活性,又具抗凝活性的双功能融合蛋白是目前国内外第三代溶栓药物研究的方向。本研究在前期采用蛋白质工程技术成功的构建并表达了重组水蛭素 12 肽-瑞替普酶(HV12p-rPA)融合蛋白,具有抗凝血和溶栓双重功能,表明该融合蛋白质可作为一种潜在的兼具抗凝和溶栓效果的新药<sup>[1-3]</sup>。为提高 HV12p-rPA 的靶向性,降低出血副作用,本研究将 HV12p-rPA 连接“靶向弹头”McAbSZ-65 制成靶向 HV12p-rPA 脂质体,采用大鼠颈动脉血栓模型考察其体内靶向溶栓效果。

### 1 仪器和材料

#### 1.1 仪器与试剂

RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器);水浴超声仪;JY92-II型超声细胞破碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);高速冷冻离心机(Beckman Counter, Allegra X-ZZR;Centrigug);透视电子显微

镜(日本电子公司, JEM-100SX 型);激光粒度(英国马尔文公司 Zeta Sizer, NanoZS-90 激光粒度仪);L- $\alpha$ -卵磷脂(注射级, from soybean, Type II-S, 14%~23%, Sigma P5638);胆固醇(成都科龙化工试剂厂);BCA 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);氯仿(成都方舟试剂厂)。McAb SZ-65(苏州大学, 蛋白浓度 1 mg/mL, 纯度 >80%)。

动物: Sprague-Dawley, ♂ 大鼠, 四川大学实验动物中心。

#### 1.2 样品制备

参照文献[4]将含有 pET-21 $\alpha$ /HV12p-rPA 重组质粒的大肠杆菌 *E. coli* BL21 (四川大学华西药学院构建、保存), 通过发酵表达得到包涵体, 进行透析复性和初步纯化, 最后将获得的 HV12p-rPA 制备成冻干粉, 得到抗凝活性为 600 ATU/mg, 溶栓活性 8782 IU/mg 的样品。

收稿日期: 2010-12-23 修回日期: 2011-02-25

基金项目: 生化工程国家重点实验室开放基金(No. KF2008-7)资助。

作者简介: 邓璇, 女, 四川大学硕士研究生。

\* 通讯作者: 余蓉, 教授。Tel: 028-85503012, E-mail: yurong@scu.edu.cn.

## 2 方法

### 2.1 HV12p-rPA 脂质体的制备

2.1.1 薄膜分散-超声法<sup>[5-6]</sup>制备脂质体 将磷脂、胆固醇溶于氯仿,减压旋转蒸发挥发干氯仿,加入 HV12p-rPA(PBS, pH7.4),水浴超声成乳。用探头超声(50 W, 间隔 2 s, 10 min)均一粒径。

2.1.2 正交实验筛选最优处方 对影响脂质体包封率的因素进行筛选,选出 4 个影响较大的因素:磷脂与胆固醇的比(A)、药物浓度(B)、PBS 体积(C)、水浴超声时间(D)。以这 4 种因素作为考察因素,每个因素取 3 个水平,采用正交设计法  $L_9(3^4)$  进行实验,结果见表 1,以包封率作为评价标准,优化处方。

Tab 1 Orthogonal design with different factors and levels

| Factors         | Level 1 | Level 2 | Level 3 |
|-----------------|---------|---------|---------|
| A PC: Chl(m: m) | 3: 1    | 4: 1    | 6: 1    |
| B Pr(mg/mL)     | 2       | 3       | 4       |
| C PBS(mL)       | 10      | 15      | 20      |
| D Time(min)     | 5       | 10      | 15      |

2.1.3 脂质体质量检查 按正交试验设计优化后的工艺制备 HV12p-rPA 脂质体 3 批,用 BCA 试剂盒测定包封率,具体操作:取 1 mL 脂质体液入 EP 管,调节 Zeta 电位,冷冻离心(14 000 r/min, 4 °C, 1 h)取上清液 20  $\mu$ L 加入在 96 孔板测定游离蛋白浓度  $W_{游}$ ;取 1 mL 脂质体液入西林瓶,加 4 mL Triton-100(3%)破乳,取 20  $\mu$ L 加入 96 孔板,测定总蛋白药物含量  $W_{总}$ ,包封率 =  $(W_{总} - W_{游})/W_{总} \times 100\%$ 。

取脂质体悬液稀释数倍,透射电子显微镜下观察其形态;

取脂质体悬液稀释适当倍数,取 1 mL,用激光粒度仪测定粒径及粒径分布;取 1 mL,用表面电位仪测定 Zeta 电位。

2.1.4 空白加样回收率的测定 制备空白脂质体,向其中加入 HV12p-rPA(PBS, pH7.4)使其质量浓度分别为 0.25, 0.15, 0.05 g/L,冷冻离心(14 000 r/min, 4 °C, 1 h),精密量取上清液 0.1 mL,测定上清液中 HV12p-rPA 的浓度,按照测得量和加入量计算其回收率。

2.1.5 HV12p-rPA 脂质体的体外释放实验 取 HV12p-rPA 脂质体悬液 5.0 mL,加 0.1 mol/L pH7.0 的 PBS 5.0 mL,置于西林瓶中,于恒温振荡仪中 37 °C 以 100 r/min 的速度振荡,分别于 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 h 定时取样,低温高速离心后,测上清液浓度,计算并绘制脂质体的体外释放曲线。

### 2.2 偶联 McAbSZ-65

取偶合剂 EDCI 将 McAbSZ-65 偶联到 HV12p-rPA 脂质体表面<sup>[7]</sup>:在 10 mL 脂质体悬液中加入 0.5 mL EDCI(5.0 mg/mL)溶液和 0.1 mL McAbSZ-65(1.0 mg/mL)。在冰水浴中磁力搅拌 2 h。

### 2.3 体内容栓实验

2.3.1 实验动物分组 Sprague-Dawley 大鼠 30 只(♂, 体重 150~200 g),随机分为 5 组,每组 6 只。分组:PBS 空白对照组;小剂量 HV12p-rPA 组(80k IU/kg);大剂量 HV12p-rPA 组(400k IU/kg);HV12p-rPA 脂质体组(80k IU/kg);连有 McAbSZ-65 的靶向 HV12p-rPA 脂质体组(80k IU/kg)。

2.3.2 大鼠颈动脉模型 实验前禁食 12 h, 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉动物,手术分离左侧颈总动脉,隔离周围组织和血管。用 6 mm × 6 mm 滤纸浸蘸 10  $\mu$ L FeCl<sub>3</sub>(20%)包裹血管外壁 10 min。待血栓形成后,立即取下滤纸条,分别输注 5 组不同的药物溶液,10 min 输注完毕。40 min 后剪取血栓段血管,精确切取 6 mm 长血栓段,称量血栓段湿重,室温下放置 24 h 后称量血栓干重。

2.3.3 统计学处理 全部数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 HV12p-rPA 脂质体制备工艺的正交实验

结果见表 2。通过表 2 分析,由极差 *R* 可知,4 种因素对包封率的影响大小依次为:C>A>D>B。综合以上结果,确定薄膜分散法制备 HV12p-rPA 脂质体的最佳处方工艺组合为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即磷脂与胆固醇的质量比为 3:1,药物浓度为 4 mg/mL, PBS 10 mL,水浴超声 10 min。

Tab 2 Results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

| No.   | A         | B         | C         | D         | EE%   |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| 1     | 1         | 1         | 1         | 1         | 87.03 |
| 2     | 1         | 2         | 2         | 2         | 87.83 |
| 3     | 1         | 3         | 3         | 3         | 85.32 |
| 4     | 2         | 1         | 2         | 3         | 85.03 |
| 5     | 2         | 2         | 3         | 1         | 79.01 |
| 6     | 2         | 3         | 1         | 2         | 87.52 |
| 7     | 3         | 1         | 3         | 2         | 81.37 |
| 8     | 3         | 2         | 1         | 3         | 85.25 |
| 9     | 3         | 3         | 2         | 1         | 81.89 |
| $K_1$ | 86.726 67 | 84.476 67 | 86.6      | 82.643 33 |       |
| $K_2$ | 83.853 33 | 84.03     | 84.916 67 | 85.573 33 |       |
| $K_3$ | 82.836 67 | 84.91     | 81.9      | 85.2      |       |
| $R$   | 3.774     | 0.793     | 4.837     | 2.99      |       |

3.2 HV12p-rPA 脂质体质量检查

最佳处方 3 批 HV12p-rPA 脂质体的平均粒径为  $(142.45 \pm 1.20)$  nm, Zeta 电位平均值为  $(-30.63 \pm 0.48)$  mV, 平均包封率为  $(91.59 \pm 1.39)\%$ (图 1~图 3)。透射电镜下观察脂质体形态, 脂质体形态为封闭的多层囊状小球(图 1)。

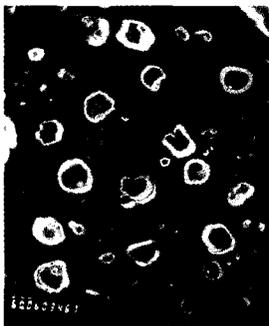


Fig 1 TEM of HV12p-rPA liposomes( $\times 60\ 000$ )

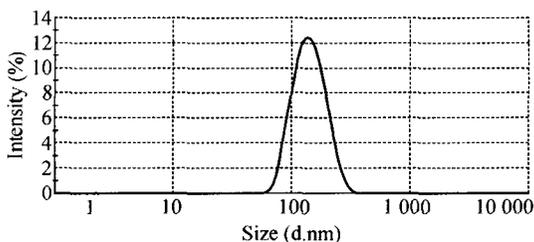


Fig 2 Size distribution by intensity of HV12p-rPA liposomes

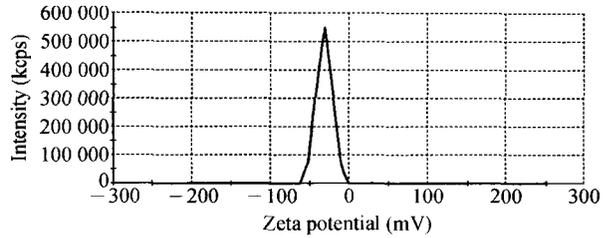


Fig 3 Zeta potential distribution of HV12p-rPA liposomes

3.3 空白加样回收率的测定

测定高、中、低 3 个浓度的空白加样回收率分别为 89.31%, 90.25%, 101.52%。

3.4 HV12p-rPA 脂质体的体外释放

以时间为横坐标, 累计释放百分率为纵坐标, 绘制体外释放曲线见图 4。24 h 内释放接近完全。

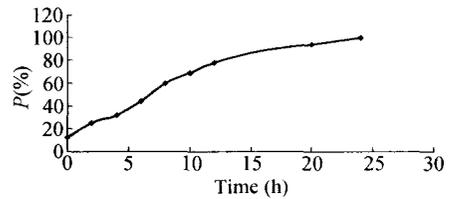
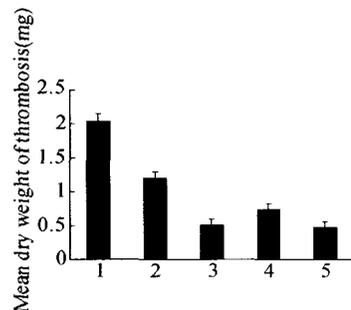


Fig 4 Release of HV12p-rPA liposomes

将释放数据用不同的释放模型拟合, 最终确定其最佳拟合模型为一级释放模型, 其方程为:  $\ln(100-P) = -0.3028t + 5.6152$  ( $r^2 = 0.9814$ )。

3.5 体内溶栓实验

血栓段湿重结果见图 5, 与 PBS 对照组  $(5.18 \pm 0.31)$  mg 进行比较, 相同剂量下  $(80k\ IU/mg)$ , 游离 HV12p-rPA 组  $(4.02 \pm 0.28)$  mg 没有统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 其它各组均有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 与普通 HV12p-rPA 脂质体组  $(3.38 \pm 0.23)$  mg 比

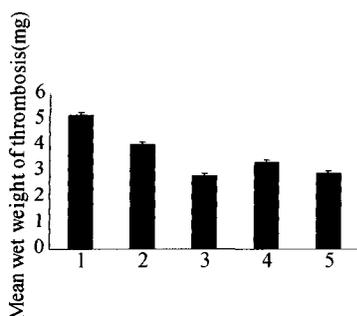


1: PBS; 2: Free HV12p-rPA (80k IU/mg); 3: Free HV12p-rPA (400k IU/mg); 4: HV12p-rPA liposome (80k IU/mg); 5: HV12p-rPA targeted liposome: (80k IU/mg)

Fig 5 Wet weights of thrombi of rats in different groups and their statistical analysis ( $n = 6$ )

较,偶连有 McAbSZ-65 的靶向 HV12p-rPA 脂质体组 ( $2.92 \pm 0.18$ ) mg 的血栓湿重明显减轻 ( $P < 0.05$ )。本实验中,靶向脂质体组与其 5 倍剂量 (400k IU/mg) 的游离 HV12p-rPA 组 ( $2.80 \pm 0.16$ ) mg 比较,靶向脂质体组湿重稍稍偏重 ( $P > 0.05$ )。

血栓干重结果如图 6,与湿重情况有所不同,与 PBS 组 ( $2.04 \pm 0.114$ ) mg 比较,相同剂量下 (80k IU/mg),各组均有统计学差异 ( $P < 0.05$ );且靶向脂质体组 ( $0.48 \pm 0.083$ ) mg 与其 5 倍剂量的游离 HV12p-rPA 组 ( $0.52 \pm 0.084$ ) mg 相比,血栓段干重轻 ( $P > 0.05$ )。



1: PBS; 2: Free HV12p-rPA (80k IU/mg); 3: Free HV12p-rPA (400k IU/mg); 4: HV12p-rPA liposome (80k IU/mg); 5: HV12p-rPA targeted liposome (80k IU/mg)

Fig 6 Dry weights of thrombi in rats of different groups and their statistical analysis ( $n=6$ )

从以上结果来看,偶联了 McAbSZ-65 的靶向 HV12p-rPA 脂质体用药量相当于游离 HV12p-rPA 用药量的 1/5 就能达到更好的溶栓效果。

#### 4 讨论

目前关于溶栓药物脂质体的制备已有一些报道<sup>[8-9]</sup>:制备的纳豆激酶脂质体,包封率为 53.44%,粒径为 235.7 nm;制备的尿激酶脂质体包封率为 65.4%,上述工艺得到的脂质体包封率偏低、粒径偏大。鉴于 HV12p-rPA 是一种人工设计全新结构、相对分子质量为 39.6 k 的大分子蛋白,其与已有报道的蛋白药物相比,HV12p-rPA 在分子质量、结构及生物活性上存在明显差异,与化学药物更是相差甚远。为了获得高包封率和粒径分布均匀的 HV12p-rPA 脂质体,本实验采用薄膜分散-超声法,可以避免蛋白质药物直接和有机溶剂接触,且探头超声始终在冰浴中进行,

可以有效降低制备过程对蛋白活性的影响<sup>[10-11]</sup>。本研究筛选了磷脂与胆固醇用量比、药物浓度、PBS 量、水浴超声时间 4 个因素设计正交试验,优化后的处方通过探头超声均一粒径,建立了包封率高达 ( $91.59 \pm 1.39$ )% 的 HV12p-rPA 脂质体的制备工艺。脂质体粒径的大小影响着脂质体在血液内传递和驻留时间,静脉注射剂要求脂质体的粒径在 100~200 nm 范围内,本研究制备的 HV12p-rPA 脂质体粒径为 ( $142.45 \pm 1.20$ ) nm,且分布均匀。

通过 Sephadex G-50 分离偶联有单抗的脂质体与游离的 McAbSZ-65,测定游离 McAbSZ-65 的浓度,根据 (偶联率 = 偶联上的蛋白质质量 / 起始蛋白质质量  $\times 100\%$ ) 计算得偶联率为 35.2%。有研究报道<sup>[12]</sup>,药物与抗体分子比在达到 10:1 时,即可使抗体失活而失去靶向性。如何保证抗体不失活时能联接足够量的药物分子,即提高药物抗体的分子比,这是制备药物抗体偶联物的一个主要难点。如果采用引入载体的方法形成药物载体-单抗复合物,同样量的抗体就可结合更多的药物,且可很好地保护酶在血液系统中的活性<sup>[13]</sup>。本研究的 HV12p-rPA 脂质体通过碳二亚胺与 McAbSZ-65 进行偶联,一个脂质体上连有约 60~70 个单抗,体内溶栓结果表明偶联有单抗的脂质体较 HV12p-rPA 脂质体靶向溶栓效果好,间接也证实了该偶联是成功的。

纤维蛋白原 (Fg) 在血液凝固过程中,被凝血酶转化为纤维蛋白,又经活化的 XI 因子作用,交联而形成不溶性凝块,血小板活化后与 Fg 特异结合是血栓形成的最后共同通路。纤维蛋白原单克隆抗体能直接作用于血小板膜上的纤维蛋白原或封闭膜上纤维蛋白原受体,而使血小板间的桥联作用发生障碍,抑制血小板的聚集。本实验将 McAbSZ-65 偶联到 HV12p-rPA 脂质体上,可以进一步提高 HV12p-rPA 的靶向性,体内溶栓实验表明 HV12p-rPA 靶向脂质体的剂量仅需游离 HV12p-rPA 的 1/5 就能达到几乎相同的溶栓,证实其体内靶向溶栓明显提高。

基于本实验制得的 HV12p-rPA 靶向脂质体已成功实现了提高其靶向溶栓的功效,减小药量的同时可避免出血副作用的目的,提示其具有成为新一代靶向性高、出血副作用小的溶栓治疗药物良好

前景。

(致谢苏州大学王兆钺教授提供的帮助和四川大学华西药学院靶向药物重点实验室石三军博士和郑雪硕士提供的宝贵建议!)

### 参考文献

- [1] Szymkowski D E. Rational optimization of proteins as drugs: a new era of medicinal biology[J]. *Drug Discovery Today*, 2004, **9**:381.
- [2] Shannon A. M, Greg A L, Arthur J, *et al.* Rational design and engineering of therapeutic proteins[J]. *Drug Discovery Today*, 2003, **8**(5):212
- [3] 余蓉, 韦利军, 吴梧桐, 等. 抗凝、溶栓双功能水蛭素 12 肽-瑞替普酶融合蛋白的模拟、构建与表达[J]. *药物生物技术*, 2007, **14**(3):168.
- [4] 梁兰, 余蓉. 透析法体外复性抗凝溶栓双功能 HV12p-rPA 融合蛋白[J]. *药物生物技术*, 2009, **16**(2):140.
- [5] Li Yang, Wenzhan Yang, Dianzhou Bi, *et al.* A novel method to prepare highly encapsulated interferon- $\alpha$ -2b containing lipo-

- somes for intramuscular sustained release[J]. *Eur J Pharm Bio*, 2006, **64**:9.
- [6] Ruica G R, Karmela B, Zeljka P. High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, **15**(5):441.
- [7] 俞功龙, 尹宗宁, 张霞. 纳豆激酶免疫脂质体及其冻干品的制备及药剂学性质评价[J]. *中国药房*, 2009, **20**(4):276.
- [8] 张霞, 尹宗宁, 王怡鑫, 等. 纳豆激酶脂质体的制备及其体外释放[J]. *中国药理学杂志*, 2007, **42**(2):279.
- [9] 王向涛. 血栓靶向尿激酶脂质体的制备及其体内溶栓效果[J]. *药学报*, 2003, **38**(3):231.
- [10] Dai C Y, Wang C, Zhao HW, *et al.* Factors affecting protein release from microcapsule prepared by liposome in alginate[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, **42**(3/4):253.
- [11] Sulkowskia W, Pentaka D, Nowaka K, *et al.* Influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability[J]. *Mol Struct*, 2005, 744.
- [12] 任献忠. 靶向制剂进展[J]. *药学进展*, 1994, **18**(2):114.
- [13] 刘银星. 恶性血液肿瘤的单克隆抗体靶向治疗[J]. *国外医学-输血及血液学分册*, 2003, **26**(1):57.

## Preparation of Thrombus - Targeted HV12p - rPA Liposomes and Its Thrombolytic Effect in Model Rats

DENG Xuan<sup>1</sup>, LIANG Lan<sup>1</sup>, GAO Man-lu<sup>1</sup>, KANG Li-mei<sup>1</sup>, YU Rong<sup>\*1</sup>, SU Zhi-guo<sup>2</sup>, WU Wu-tong<sup>3</sup>

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract** To prepare thrombus-targeted fusion protein of 12 peptide of hirudin and reteplase(HV12p-rPA) liposomes and to observe its improved thrombolytic activity on thrombus model rats, HV12p-rPA liposome was prepared by a film-ultrasonic method. Orthogonal design was employed to investigate factors influencing the encapsulation efficiency of HV12p-rPA liposomes. Thrombus-targeted HV12p-rPA liposomes coupled with anti-fibrin monoclonal antibody SZ-65 were prepared by carbodiimide (EDCI) method. Experiment *in vivo*: a rat thrombosis model of carotid artery was induced with ferric chloride. Encapsulation efficiency of HV12p-rPA in liposome reached  $(91.59 \pm 1.39)\%$  after optimization, with the mean size of  $(142.45 \pm 1.20)$  nm and the Zeta potential of  $(-30.63 \pm 0.48)$  mV. The obtained targeted liposomes were characteristic of high entrapment efficiency and small mean diameter. At the same dose age (80 k IU/kg), compared to the dry thrombi weights of PBS control group ( $2.04 \pm 0.114$ ) mg, free HV12p-rPA group ( $1.2 \pm 0.100$ ) mg and HV12p-rPA liposomes group ( $0.74 \pm 0.089$ ) mg, those of targeted HV12p-rPA liposomes group ( $0.48 \pm 0.083$ ) mg were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared to free HV12p-rPA liposomes of 5 times of dose ( $0.52 \pm 0.084$ ) mg, the targeted HV12p-rPA liposomes showed the lighter dry weight ( $P > 0.05$ ). The targeted HV12p-rPA liposomes displayed a good targeted thrombolytic effect.

**Key words** HV12p-rPA, Liposome, Thrombus-targeted, Common carotid artery thrombus model