

聚乙二醇衍生化磷脂与脂质体立体稳定性

丁劲松, 杨敏, 陈琼

(中南大学湘雅二医院临床药学研究室, 湖南长沙 410011)

摘要:综述了聚乙二醇(PEG)衍生化磷脂的种类、分子量、用量等对脂质体立体稳定性的影响,阐明了PEG衍生化磷脂改善脂质体稳定性的机理,并对其在延长脂质体体内循环时间及在新型脂质体中的应用作了简要介绍。

关键词:聚乙二醇衍生化磷脂; 脂质体; 立体稳定性; 长循环

中图分类号:R944.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8255(2004)01-0055-04

脂质体具有靶向、长效、可降低药物毒性及增加药物稳定性等多方面的优点。但也存在一定的不足和问题,如脂质成分易氧化水解、脂质体易聚集以及脂质体进入血循环后易被网状内皮系统(RES)细胞快速清除、靶向脂质体在体内发挥作用前难以保证其完整性等。为克服以上不足,立体稳定脂质体应运而生。立体稳定脂质体是一种表面含有天然或合成聚合物修饰的类脂衍生物的新型脂质体。修饰聚合物的种类有聚乙二醇(PEG)、聚丙烯酰胺(PPA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等,其中PEG是最常用的一种。PEG分子与磷脂分子通过共价键结合形成PEG衍生化磷脂,能有效地保护脂质体,使脂质体物理、化学及生物稳定性大大提高。

实验证明,PEG衍生化磷脂能降低脂质体的渗漏率,减少其聚集和融合,延长有效期。在体循环中则可抑制细胞粘附,屏蔽RES对脂质体的识别和摄取,延长脂质体体内循环时间,因此,此类脂质体又称长循环脂质体。如用二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、胆固醇(CH)、胆固醇-3-硫酸酯、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)-PEG2000通过冻融法制得的链激酶脂质体, $t_{1/2}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 比直接使用药物时分别增大16.3倍和6.1倍^[1]。在炎症小鼠模型中,吡啶美辛的长循环脂质体[磷脂酰胆碱(PC):CH:PEG衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)=1:0.5:0.16]比传统脂质体(PC:CH:PE=1:0.5:0.16)的清除减慢, $AUC_{0-\infty}$ 显著增大,表明PEG-磷脂衍生物能明显延长脂质体的体循环时间^[2]。

1 PEG衍生化磷脂提高脂质体稳定性的机制

1.1 粒子间斥力

PEG-磷脂在脂质体的脂质双分子层表面形成聚合物保护层,使粒子间斥力增加,从而使脂质体稳定性增

加。理论上,距离粒子表面s处既存在着范德华引力,又存在着粒子间斥力,当斥力大于或等于引力时,粒子稳定;反之,则脂质体聚集。如当s约为粒子直径的1/10时,即聚合物衣层厚度约为粒子直径的10%时,粒子之间的斥力就足以克服与其它大分子或粒子的相互作用^[3]。随PEG分子量的增加,粒子间斥力增加,脂质体也越稳定。Needham等^[4]用X射线衍射研究了含4%摩尔分数PEG(1900)-磷脂的脂质体(磷脂:CH为2:1)双分子层结构和粒子间斥力,结果表明,在该浓度,结合的聚合物从脂质体表面伸出大约50Å(5nm),增加了膜与膜之间的斥力。这有效地减少了脂质体聚集、融合现象的发生,并抑制脂质体与蛋白、细胞的粘附,增强了其体内外稳定性。

1.2 构象云结构

具有柔韧性和亲水性的PEG聚合物在脂质体表面形成的致密“构象云”(conformational clouds),可产生较大的空间位阻效应(steric barrier),抑制其它高分子物质与脂质体表面接触,包括血浆成分的吸附,防止脂质体被RES识别和摄取,甚至在较低浓度下就能产生很强的保护作用。这种保护作用可能同疏水链与脂质体膜核心或表面相互作用的能量的平衡和PEG链在溶液中自由运动的能量有关^[5]。Belsito等^[6]用电子自旋共振(ESR)和光密度测量法研究了水分散体中PEG-PE与卵磷脂的相互作用,证实了构象云结构的存在。

1.3 水化膜结构

PEG的亲水性可使脂质体表面形成水化膜,掩盖脂质体表面的疏水性结合位点,降低RES对脂质体的识别和摄取,延长体循环时间^[7,8]。如PEG-PE的疏水性长链有利于将分子插入脂膜,而亲水性部分则伸展于脂膜表面,在脂质体表面形成较厚的水化膜保护层,从而提高脂膜亲水性并造成空间位阻,增强稳定性,这种作用随PEG分子量增加而增加。水化膜保护层的形成增加了脂质体的亲水性,使脂质体在极性溶剂中更稳定,有利于脂质体的保存^[9]。

收稿日期:2002-07-16

作者简介:丁劲松(1972),男,讲师,从事药物新剂型及其生物有效性研究。

Tel:0731-5524222*2275, 4436720

E-mail: dingjs0221@163.com

2 影响 PEG 衍生化磷脂脂质体稳定性的因素

2.1 PEG 分子量

随 PEG 分子量的增加(由 2000 增至 5000),其延缓脂质体中钙黄绿素(calcein)渗漏的作用明显增强,屏蔽 RES 对脂质体的识别和摄取作用也增强^[9]。Bedu-Addo 等^[10,11]证明增大 PEG-磷脂中 PEG 的分子量及其结合率能有效抑制脂质体的聚集。PEG-PE 与 PC 的混合物的物理状态取决于 PEG-PE 中 PEG 的分子量,3 种物理状态分别为:各组分呈可混溶的薄层相、分离的薄层相及混合胶团。在研究分子量分别为 1000~3000、5000、12000 的短、中长、长链 PEG 对脂质体稳定性的影响时发现,7% 摩尔分数以上的 PEG(1000~3000)-二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)和 11% 摩尔分数的 PEG(5000)-DPPE 在二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)中有强烈的形成混合胶团的趋势。所有浓度的 PEG(12000)-DPPE 和大于 8% 摩尔分数的 PEG(5000)-DPPE 则均形成分离的薄层相。表明低浓度的短链 PEG 可形成混溶的脂质双层,最适宜用作对药物载体的修饰,而在浓度较高时易使脂质双层溶解而导致药物泄露。高分子量的 PEG 可使脂质体更稳定,但分子量大于 5000 的 PEG 在某些处方中不适用,原因可能在于产生了相分离。

2.2 PEG 含量

脂质体的稳定性随 PEG 含量的增加而增加。Belsito 等^[6]发现脂质体聚合物的稳定性对亲水性端基的大小和 PEG-PE 的含量有很强的依赖性,用自旋标记的 ESR 对 PC/PEG-PE 混合物的定量研究发现,脂质双分子层结构随 PEG-PE 含量的改变而改变。随 PEG-磷脂浓度的增加,其抑制脂质体凝聚程度也增大^[12]。Chin 等^[13]发现结合 15% 摩尔分数 DSPE-PEG(2000)的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质体的循环时间与含有 5% 摩尔分数 DSPE-PEG(2000)的中性脂质体循环时间明显不同。前者可有效地降低 PS 脂质体的亲和力,减少 PS 介导的血浆蛋白粘附,大于 80% 的凝血素粘附和促凝血活性被抑制;当含量下降时该保护作用降低。随 PEG-磷脂浓度的增加,粒子间斥力及脂质体的体内、外稳定性也增大。

2.3 PEG-磷脂的类型

不同 PEG 聚合物的性质及体内表现均不同。在 37℃、pH7.4 缓冲溶液中,PEG(5000)-DPPE 和 PEG(5000)-DSPE 的临界胶团浓度分别为 70 和 9mmol/L。当这些 PEG-磷脂的胶团分散体与含有 16 或 18 个碳原子的磷脂膜囊泡混合后,PEG-磷脂胶团分离成单体,然后自发结合到已形成的囊泡的表面。在结合过程中,PEG-DPPE 的结合率比 PEG-DSPE 快,这是因为前者分离成

单体的速率较快。而 PEG-DSPE 的强疏水作用使其结合率常数比 PEG-DPPE 大。PEG-DSPE 和 C₁₈ 膜的组合为最佳的热力学稳定配对^[14]。Parr 等^[15]研究表明 DSPC、CH 及单甲氧基聚乙二醇 2000-琥珀酰-棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺[MePEG(2000)-S-POPE] (50:45:5,摩尔比)组成的大单室脂质体(LUVs)只能稍延长循环时间。而由 DSPC、CH 和 MePEG(2000)-S-DSPE 组成的 LUVs 在体内却极少发生 PEG 衍生化磷脂层的化学破坏,循环时间显著延长。可见 DSPE 较 POPE 与 PEG(2000)结合的效果更优。

2.4 PEG-磷脂脂质体的粒径

研究表明,用不同的 PEG-磷脂可制备不同粒径的脂质微粒(多室、小单室、大单室脂质体),稳定性较好;半年后 PEG-磷脂脂质体在缓冲溶液中释出的亲水性标记物小于 5%,在血浆中 $t_{1/2}$ 长达几天^[16]。Litzinger 等^[17]制备了 >300nm、150~200nm 和 <70nm 的 3 种粒径分布的 PEG-磷脂脂质体,并考察了在小鼠体内的分布,结果表明,大粒径和小粒径的 PEG-磷脂脂质体分别在脾和肝中的浓度较高,中间粒径的具有长循环特性。小粒径脂质体长循环减弱的原因直接与 PEG-PE 的活性有关,而大粒径脂质体则可能是通过过滤机制被脾摄取。脂质体在血中的稳定性、清除率及生物分布情况都取决于其组成、粒径及荷电情况,其中 100~200nm 粒径范围内的脂质体由于空间位阻的原因在血液中较稳定^[18]。Unezaki 等^[19]研究的温度敏感型 PEG-磷脂脂质体,其最佳平均粒径也在 180~200nm 范围内。

3 PEG 衍生化磷脂在新型脂质体中的应用

3.1 pH 敏感脂质体

结合 PEG-磷脂的脂质体可制成低 pH 敏感的立体稳定脂质体。Guo 等^[20]制备了对较低 pH 敏感的 PEG 结合物(POD),在中性环境下能稳定 3h 以上,但在 pH5 下 1h 内就可能完全降解。含有 10%POD 和 90% 二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)的脂质体在中性缓冲液中能稳定存在 12h 以上;然而当该脂质体处于温和酸性条件(pH5.5)下时,脂质体很快聚集并在 30min 内释出大部分内容物。因此可通过 pH 控制药物靶向至弱酸性的生理环境(如核内体、固体瘤和炎性组织)释放。

3.2 阳离子脂质体

当药物的电性与脂质体膜电性相反时,药物包封率高且稳定。结合不同类型的 PEG 聚合物可制得中性、负电性、正电性脂质体。如一种新型的结合阳离子 PEG-磷脂(CPL)的脂质体^[21],能插入已形成的囊泡中并增强脂质体的稳定性。对以 4 种端基上含有不同正电

荷的CPL(分别为CPL₁~CPL₄)制得的阳离子LUVs的胶束溶液的研究发现,CPL插入LUVs外部小叶上的方式在某种程度上取决于温度、时间、CPL/磷脂的比例和LUVs的结构,同时也与LUVs中的CPL种类有关。CPL₃可使脂质体与细胞的粘附增加3倍,而CPL₄可增加10倍。同时,磷脂摄取的增加与总的表面电荷无关,而与CPL末梢端基上增加的正电荷的密度有关。

3.3 免疫脂质体

传统的免疫脂质体具有良好的靶向性,但在体内易被清除。采用PEG-磷脂连接特异性抗体则可以达到长循环的效果,但结合方式不同,脂质体的靶向性也不同。Maruyama等^[22]研究了传统免疫脂质体(A)、含PEG的免疫脂质体(B)和含6%摩尔分数DSPE-PEG-COOH的PC-CH(2:1)新型免疫脂质体(C)的靶向性。小鼠肺特异性免疫试验结果表明,由于PEG可减少RES的摄取而使B具有长循环特征,但B的抗原-抗体结合仅为A的一半,这可能与PEG链的空间位阻阻碍了抗原-抗体的特异性结合有关。而C不仅具有长循环特征,其抗原-抗体结合率约为A的1.3倍,表明免疫性抗体与PEG链的末端结合可以减少PEG链空间位阻对抗原-抗体结合的屏蔽作用。

4 结语

PEG衍生化磷脂对提高脂质体稳定性有众多优点,但新的PEG衍生化磷脂的结构鉴定、毒性研究等费时费力,限制了它的广泛应用。已有研究表明PPA、PVP、ATTAn低聚体、聚-2-甲基咪唑啉(PMOZ)、聚-2-乙基咪唑啉(PEOZ)等与磷脂结合后显示与PEG衍生化磷脂相似的体内行为,可为寻找替代品提供新的方向^[23~25]。PEG衍生化磷脂脂质体的良好稳定性使其可用于其它药物传递系统,如利用PEG-磷脂脂质体包裹造影剂,用于肾脏等器官的影像诊断;或制成喷雾剂,用于肺结核等肺部疾病的治疗,以减少口服抗结核药物的肝损害等。

参考文献:

[1] Kim IS,Choi HG,Choi HS,*et al.* Prolonged systemic delivery of streptokinase using liposome[J]. *Arch Pharm Res*,1998,21(3): 248-252.

[2] Woodle MC,Storm G,Newman MS,*et al.* Prolonged systemic delivery of peptide drugs by long-circulating liposomes: illustration with vasopressin in the Brattleboro rat[J]. *Pharm Res*, 1992,9(2): 260-265.

[3] Lasic DD. Novel application of liposomes[J]. *Trends*

Biotechnol,1998,16(7):307-321.

[4] Needham D,McIntosh TJ,Lasic DD. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes[J]. *Biochim Biophys Acta*,1992,1108(1): 40-48.

[5] Torchili VP. Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals [J]. *J Microencapsul*, 1998,15(1): 1-19.

[6] Belsito S,Bartucci R,Montesano G,*et al.* Molecular and mesoscopic properties of hydrophilic polymer-grafted phospholipids mixed with phosphatidylcholine in aqueous dispersion: interaction of dipalmitoyl *N*-poly (ethylene glycol) phosphatidylethanolamine with dipalmitoylphosphatidylcholine studied by spectrophotometry and spin-label electron spin resonance[J]. *Biophys J*,2000,78(3)1420-1430.

[7] Woodle MC,Lasic DD. Sterically stabilized liposomes[J]. *Biochim Biophys Acta*,1992,1113(2): 171-199.

[8] Blume G, Cevc G. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993,1146(2): 157-168.

[9] 侯新朴,张俊梅,鲁先道. PEG修饰脂膜对延长脂质体在血内循环时间的研究[J]. *药学学报*,1996,31(6): 451-454.

[10] Bedu-Addo FK,Tang P,Xu Y,*et al.* Interaction of polyethylene glycol-phospholipid conjugates with cholesterol-phosphatidylcholine mixtures:sterically stabilized liposome formulations[J]. *Pharm Res*,1996,13(5): 718-724.

[11] Bedu-Addo FK,Tang P,Xu Y,*et al.* Effects of polyethylene glycol chain length and phospholipid acyl chain composition on the interaction of polyethylene glycol-phospholipid conjugates with phospholipid: implications in liposomal drug delivery[J]. *Pharm Res*,1996,13(5): 710-717.

[12] Mori A,Klibanov AL,Torchilin VP,*et al.* Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes *in vivo*[J]. *FEBS Lett*,1991, 284:263-266.

[13] Chiu GN,Bally MB,Mayer LD. Selective protein interactins with phosphatidylserine containing liposomes alter the steric stabilization properties of poly (ethylene glycol)[J]. *Biochim Biophys Acta*,2001,1510(1-2): 56-59.

[14] Sou K,Endo T,Takeoka S,*et al.* Poly (ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly (ethylene glycol)-lipid into the vesicles [J]. *Bioconjug Chem*,2000,11(3): 372-379.

[15] Parr MJ,Ansell SM,Choi LS,*et al.* Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicle[J].

- Biochim Biophys Acta*, 1994, **1195**(1): 21-30.
- [16] Zeisig R, Eue I, Kosch M, *et al.* Preparation and properties of sterically stabilized hexadecylphosphocholine (miltefosine)-liposomes and influence of this modification on macrophage activation. Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly (ethylene glycol)-lipids[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1283**(2): 177-184.
- [17] Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, *et al.* Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1190**(1): 99-107.
- [18] Oku N, Namba Y. Long-circulating liposomes[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1994, **11**(4): 231-270.
- [19] Unezaki S, Maruyama K, Takahashi N, *et al.* Enhanced delivery and antitumor activity of doxorubicin using long-circulating thermosensitive liposomes containing amphipathic polyethylene glycol in combination with local hyperthermia[J]. *Pharm Res*, 1994, **11**(8): 1180-1185.
- [20] Guo X, Szoka FC Jr. Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG-diortho ester-lipid conjugate[J]. *Bioconjug Chem*, 2001, **12**(2): 291-300.
- [21] Fenske DB, Palmer LR, Chen T, *et al.* Cationic poly(ethylene glycol) lipids incorporated into pre-formed vesicles enhance binding and uptake to BHK cell[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1512**(2): 259-272.
- [22] Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, *et al.* Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1234**(1): 74-80.
- [23] Ansell SM, Kojic LD, Hankins JS, *et al.* Application of oligo-(14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoic acid) lipid conjugates as steric barrier molecules in liposomal formulations[J]. *Bioconjug Chem*, 1999, **10**(4): 653-666.
- [24] Torchilin VP, Shtilman MI, Trubetsky VS, *et al.* Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time *in vivo*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1195**(1): 181-184.
- [25] Woodle MC, Engbers CM, Zalipsky S. New amphipathic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes[J]. *Bioconjug Chem*, 1994, **5**(6): 493-496.

Polyethylene glycol-phospholipid and liposomes stereo-stability

DING Jing-Song, YANG Min, CHEN Qiong

(Clinic Pharmacy Research Laboratory, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011)

ABSTRACT: The influence of kinds, molecular weight and dosage of polyethylene glycol-phospholipid (PEG-lipid) on liposomes stereo-stability are reviewed. The mechanism of PEG-lipid to improve liposomes stability is explained, and the applications of PEG-lipid to long-circulation and some new types of liposome are introduced.

Key Words: PEG-lipid; liposomes; stereo-stability; long-circulation

~~~~~

### 世界制药原料中国展 (CPhI China 2003) 胜利闭幕

由欧洲博闻有限公司和中国医药保健品进出口商会主办、上海博华国际展览有限公司承办的世界制药原料中国展 (CPhI China 2003) 于 2003 年 12 月 8 日~10 日在上海光大会展中心隆重举行。本届展会展览总面积达 16000m<sup>2</sup>, 净面积为 7084m<sup>2</sup>。共有来自美、德、法、英、日本、西班牙、意大利、瑞士、瑞典、俄罗斯、新加坡、韩、印度、南非、捷克、孟加拉、中国大陆和香港、台湾的 455 家厂商参加展出。3 天共吸引了包括来自 53 个国家和地区的专业观众近 11000 名前来参观。

目前, CPhI China 2004 的参展报名已开始, 在本届展会现场共收到中外方参展预订表 540 份, 预订净面积超过 7500m<sup>2</sup>。如需更深入了解“CPhI China 2004”, 欢迎您浏览 [www.cphi-china.com](http://www.cphi-china.com)。

### 罗门哈斯功能化学品业务助兴中国医药产业

世界制药原料中国展(CPhI)2003 年 12 月 8 日在上海光大会展中心召开。在展览会中, 罗门哈斯公司功能化学品业务部门展示了许多特种化学品和离子交换树脂产品。在特种化学品领域, 该公司是世界最大的硼氢化钠供应商之一, 在欧洲和美国拥有两个世界级的氢化物工厂。该公司为中国的医药领域提供生产和提纯过程中使用的高效还原剂, 其产品范围包括氢化物还原剂、金属氢化物、有机磷化合物等, 可为客户提供多种产品以选择, 来满足不同的需求和应用。欲了解更多信息, 可浏览该公司网站: [www.rohmhaas.com.cn](http://www.rohmhaas.com.cn)。