

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

TESTING METHODS

A FIZIKAI-KÉMIAI MÓDSZEREK SZEREPE A LIPOSZÓMA ALAPÚ KIS INTERFERÁLÓ RNS (siRNS) SZÁLLÍTÓRENDSZEREK JELLEMZÉSÉBEN

ROLE OF PHYSICO-CHEMICAL METHODS FOR CHARACTERIZATION OF siRNA LIPID-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS

EMMER JÁNOS¹, LOVRITY ZITA², KISS-TÓTH ÉVA¹, KOSKA PÉTER¹, SZALAI ADRIENN¹, FODOR BERTALAN¹

Kulcsszavak: karakterizálás, siRNS, liposzóma, lipoplex, áttekintés.

Keywords: characterization, siRNA, liposome, lipoplex, review.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az siRNS *in vivo* célba juttatása legeredményesebben lipid alapú szállítórendszerekkel valósítható meg. Mivel az siRNS alapú terápiát egyre újabb területeken használják, ehhez újfajta lipideket szintetizálnak, hogy optimalizálják a biológiai hatást. Ennek velejárója a fizikai-kémiai módszerek fejlesztése, hogy tökéletesen megérthessük ezeknek az összetett rendszereknek a felépítését és stabilitását. A fizikai-kémiai karakterizálás teremti meg az alapot egy hatékony analitikai ellenőrzési terv kialakításához az siRNS szállítórendszerek előállításánál. Az összefoglalónk célja egy rövid áttekintés a liposzóma alapú kis interferáló RNS (siRNS) szállítórendszerek jellemzésére alkalmas vizsgálati módszerekről.

Abstract

siRNA delivery *in vivo* has been most successfully achieved using lipid-based drug delivery systems. As newer targets for siRNA are identified and novel lipids are synthesized to optimize their *in vivo* efficiency, concomitant development of physicochemical methodologies that can improve understanding of the assembly and stability of these complex systems is critical. Physicochemical characterization thus forms the basis of developing an effective analytical control strategy for siRNA delivery systems. In this short review, physicochemical techniques used to characterize liposome-based siRNA delivery systems are discussed.

BEVEZETÉS

A kis interferáló RNS-ek új távlatokat nyithatnak a génterápiában. Az RNS interferencia (RNSi) egy szekvencia-specifikus géncsendesítési folyamat, mely duplaszálú (sense- és antisense szálak) RNS molekulák közreműködésével megy végbe. A folyamat következtében rövid- vagy hosszú távú génexpressziós csendesítés következhet be DNS,

1. Miskolci Egyetem, Egészségügyi Kar, Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék
2. Miskolci Egyetem, Műszaki Anyagtudományi Kar, Tüzeléstan és Hőenergia Intézeti Tanszék

RNS illetve fehérje szintjén. Az interferencia közvetítésében a kis RNS molekulák három csoportja vesz részt: kis interferáló RNS (siRNS), mikro RNS (miRNS), kis hajtű RNS (shRNS). Szerkezeti jellegzetességük, hogy körülbelül 21-26 nukleotidból állnak.

Az siRNS-ek egyetlen mRNS-re specifikusak és tökéletesen komplementerek a célszekvenciával. Az siRNS-ek működésére, az RNS-célszekvenciával való kötődést követően, a hírvivő RNS enzimatisz degradációja a jellemző (RNS-interferencia). A mellékhatások csökkentése érdekében célszerű az interferenciát kiváltó RNS-molekulákat csak azokba a sejtekbe bejuttatni, ahol a célzott géncsendesítést elő akarjuk idézni.

A csupasz siRNS-ek spontán felvétele kis hatásfokú, mivel a véráramban lebomlanak a nukleázok bontó hatása miatt, és a vese kiválasztja ezeket a kis tömegű, polianionos szerkezetű molekulákat. Felezési idejük a véráramban kisebb, mint egy óra. A hatásfokot csökkenti, hogy negatív felszíni töltésük miatt nehezen jutnak át a célsejt membránján. A hatásfok növelése a mechanikai bejuttatás és a kémiai módosítás mellett a különböző szállítórendszerek alkalmazása [1]. A szállítórendszerek lehetnek vírus- és nem-virális vektorok. Vírus vektorokkal hatékony a bejuttatás, hátránya viszont a vírus fehérjék miatti immunválasz kialakulása. A nem-virális vektor lehet biodegradábilis (pl. lipoplex, liposzóma) és nem biodegradábilis (pl. polimer, nanokapszula, dendrimer). A liposzómák számos előnnyel rendelkeznek: változatos formában és összetételben könnyen előállíthatók, alkalmazásuk biztonságos és alkalmasak nukleinsav hordozók kialakítására.

Jelen munkánkban rövid áttekintést adunk a liposzóma alapú kis interferáló RNS (siRNS) szállítórendszerek jellemzésére alkalmas vizsgálati módszerekről.

LIPOSZÓMÁLIS SZÁLLÍTÓRENDSZEREK JELLEMZÉSE

Lipidek alkalmazása genetikai anyagok szállítására már régóta ismert [2]. A liposzómák foszfolipid kettősmembránnal burkolt üreges

gömbök, amelyek magukba zárják a zsír- vagy vízoldható anyagokat. A szállításra használt liposzómák kettősrétege általában több összetevőből áll, tipikusan lipidekből, koleszterinből és polietilén-glikol (PEG)-lipidekből. A képződött liposzómák termodinamikailag stabilak, ezért alkalmasak gyógyszerek és genetikai anyagok szállítására [3]. Ezzel ellentétben a lipoplexek, amelyek spontán képződnek kationos lipidek és negatív töltésű nukleinsavak kölcsönhatásaként, heterogénebb szerkezettel rendelkeznek és instabilak. A lipoplexek két fő jellemzője a lipid összetétel és a töltésarány a lipid és a nukleinsav között. A lipoplexek oldatban lassan aggregálódnak, ezért közvetlenül felhasználás előtt kell őket készíteni [4].

Az siRNS-ek, mivel jól oldódnak vízben, alkalmasak arra, hogy a liposzómák belső vizes közegében, nagy koncentrációban bezárásra kerüljenek. A liposzómába zárt siRNS stabil, mert az RNS molekula elektromos töltése és mérete meggátolja a passzív diffúziót a liposzóma kettősrétegén át [5].

Gomez-Hens és Fernandez-Romero [6] a liposzómák jellemző tulajdonságait három csoportba sorolta:

- Morfológiai jellemzők: méret, alak, fizikai stabilitás, méreteloszlás vagy polidiszperzitás, felületi elektromos töltés.
- Szerkezeti jellemzők: Lipid-összetétel, belső szerkezet, átalakulási hőmérséklet, permeabilitás és fluiditás.
- Funkcionális jellemzők: Bezárás határfoka, kémiai stabilitás, reakcióképesség.

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A liposzómák tulajdonságait alapvetően a lipid összetétel határozza meg. Meyer és munkatársai a lipidek közvetlen mérésére fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszert dolgoztak ki UV detektálással, 205 nm hullámhosszon [7]. Nagyon fontos, hogy az előállított kis interferáló RNS (siRNA)-liposzóma szállítórendszerek jellemzésére megfelelő analitikai módszereket alkalmazzunk. A módszerek akkor megfelelőek, ha reprodukálhatók, pontosak és gyorsak. A kritikus méretek azok, amelyek meghatározzák a készítmény méretét, monodiszperzitását, az siRNA bezárás határfokát és a részecskék felületi töltését. Mivel a felsorolt tulajdonságok mindegyike befolyásolhatja a farmakológiai hatást, és mindegyik változhat az időben, ezért fontos minden paraméter folyamatos ellenőrzésére, a megfelelő vizsgálati módszer alkalmazása. Kapoor és munkatársai [8] összefoglalták a lipid alapú siRNA szállítórendszerek fő jellemzőit

és a leggyakrabban alkalmazott vizsgálati módszereket.

RÉSZECSKEMÉRET MEGHATÁROZÁSA

A liposzómális készítmények részecskeméretének meghatározására általában kétféle módszert használnak. Az egyik a közvetlen megjelenítés pásztázó (SEM) vagy transzmissziós (TEM) elektronmikroszkóppal, a másik közvetett módszer dinamikus fényszórással (DLS) vagy foton korrelációs spektroszkópiával (PCS) [5,8]. Nagyon fontos megadni, hogy milyen módszerrel mértük a részecskeméretet, mert a különböző módszerek eltérő értékeket adhatnak.

Elektronmikroszkópos vizsgálatnál kétdimenziós képet kapunk. Az ideális liposzóma gömb alakú, ezért az átlagos átmérő a képiértékelés módjától is függ. Az elektronmikroszkópos méretmeghatározás nem alkalmas folyamatok követésére és minőségellenőrzésre, mert a minta-előkészítés hosszadalmas, a vizsgált részecskék száma kicsi, ami magában hordozza a nem reprezentatív minta veszélyét, ezáltal növeli a hibalehetőséget.

A dinamikus fényszórás méréshez a liposzómákat folyadékban kell szuszpendálni. A szórt fény intenzitásának időbeni fluktuációját elemzik, ami abból adódik, hogy a fényt szóró részecskék Brown-mozgást végeznek, ezért a szóró centrum helyzete és orientációja folytonosan változik. Minél kisebb a részecske, annál gyorsabb a mozgása. Az így meghatározott méret az ún. hidrodinamikai átmérő, ami nem azonos a geometriai mérettel.

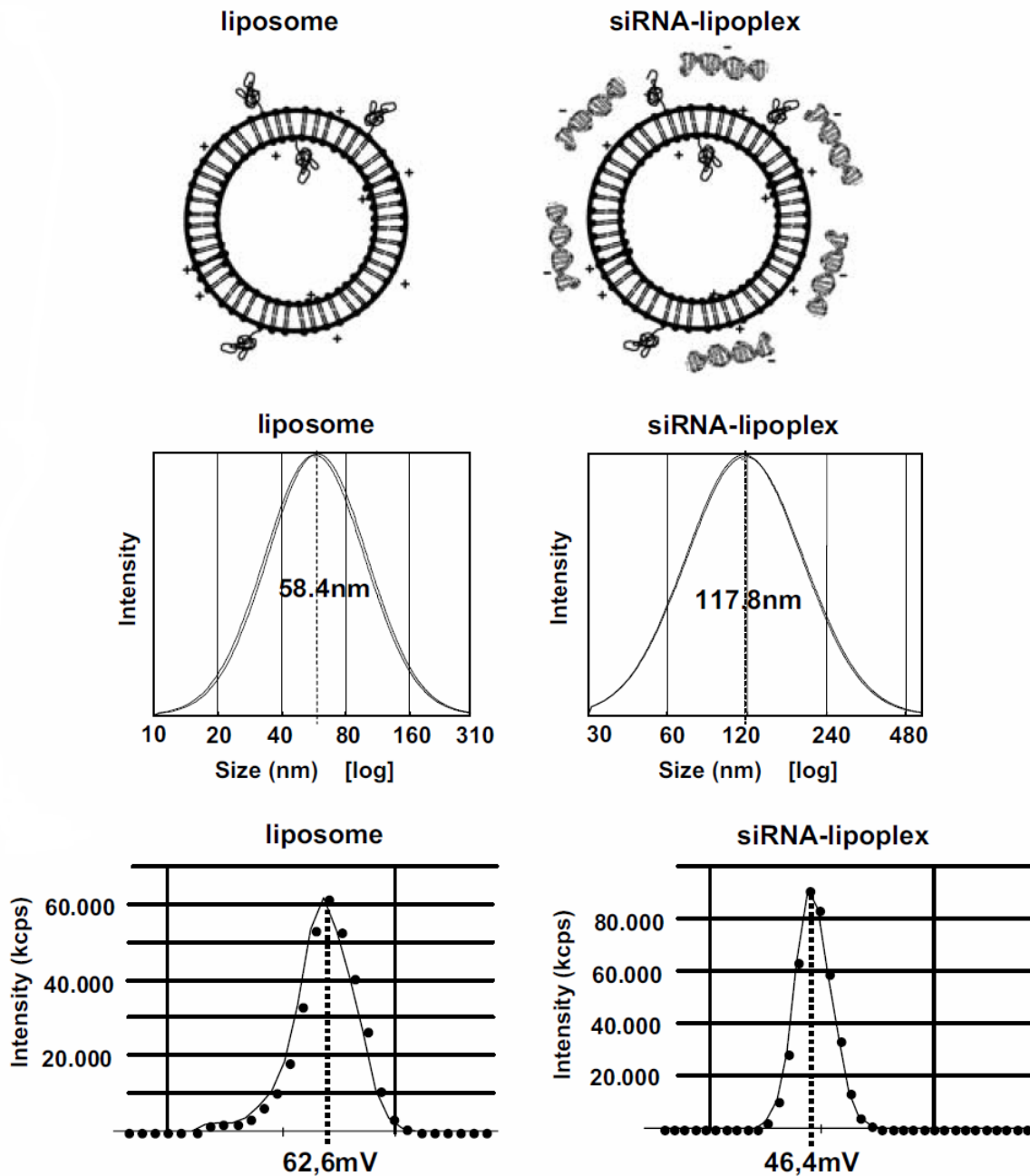
Santel és munkatársai [9] kvázi rugalmas fényszórással (QELS) mérték liposzómák és siRNS lipoplex szállítórendszerek méreteloszlását.

ZÉTA POTENCIÁL MÉRÉSE

A zéta-potenciál a liposzómák felületi töltésének mértéke. Ez két okból is érdekes. Egyrészt a töltés hatással van a részecske stabilitására, másrészt a liposzóma farmakológiai viselkedésére. Vizes oldatban az elektromos töltéssel rendelkező diszpergált részecskéket egy ellentétes töltésű diffúz ionréteg veszi körül, amelynek egy része erősen kötött (ún. Stern réteg), majd könnyebben megbontható réteg következik. A két réteget elválasztó határvonalon mérhető potenciál az ún. zéta-potenciál. Ha a zéta-potenciál értéke nulla, akkor a rendszerek stabilitása lecsökken, a részecskék könnyen összetapadhatnak, koagulátumok, aggregátumok alakulhatnak ki. Ha a zéta-potenciál értéke pozitív vagy negatív irányban messzebb van az izoelektromos ponttól, tapasztalatok alapján az érték nagyobb, mint + 30

mV vagy kisebb, mint - 30 mV, a kolloid rendszer stabil, a részecskék tasztíják egymást, összetapadásuk valószínűsége lecsökken. A zéta-potenciál értékét befolyásolja a pH, a közeg vezetőképessége, az oldott ionok minősége és mennyisége.

Több szerző leírta [8, 9, 13, 15] liposzómák és siRNS lipoplex szállítórendszerek felületi töltésének meghatározását zéta-potenciál méréssel.



1. ábra Pozitív töltésű liposzómák és az siRNS-lipoplexek sematikus rajza, méreteloszlása (DLS módszerrel mérve) és Zéta-potenciálja, Santel és munkatársai [9] szerint

BEZÁRÁSI HATÉKONYSÁG MEGHATÁROZÁSA

A bezárási hatékonyság (EE: Encapsulation efficiency) megadja, hogy mennyi siRNS tölthető

be a liposzómális hordozóba. Az EE a következő képletek valamelyikével számolható [8]:

$$EE\% = \frac{\text{Bezárt siRNS koncentráció}}{\text{Kiindulási siRNS koncentráció}} \times 100$$

$$EE\% = 100 - \left(\frac{\text{Szabad siRNS koncentráció}}{\text{Kiindulási siRNS koncentráció}} \times 100 \right)$$

A bezárt siRNA koncentráció méréséhez a liposzómák kettős rétegét megbontják valamilyen nem ionos tenziddel, általában TritonX-100-al. Az siRNS koncentráció mérésére többek között az ultraibolya-látható (UV-Vis) spektroszkópiát használják, mérik az abszorbanciát 260 nm hullámhosszon vagy a fluoreszcenciát (RiboGreen-nel jelölt siRNS) 490 nm/520 nm hullámhosszon. Hirsch és munkatársai [5] HPLC módszerrel mérték az siRNS koncentrációt UV és fluoreszcens detektálással, az siRNS-t tetrametilrodaminnal és fluoreszcenciával jelölték. Egy másik technika a centrifugálással végzett ultraszűrés. Ezzel a módszerrel a lipoplexeket egy 30-100 kDa pórusméretű membránon szűrik át, így a szabad siRNS átmegegy, a bezárt siRNS-t pedig visszatartja a membrán. A szabad siRNS koncentrációját abszorbancia vagy fluoreszcencia méréssel határozzák meg. A kromatográfiai vizsgálati módszerek közül a kapilláris gél elektroforézis (CGE), az anioncserélő nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (AX-HPLC) és a fordított fázisú, ionpár kromatográfia (RPIP-HPLC) alkalmas az siRNS készítmények analízisére [10]. Az RPIP-HPLC módszer jó felbontást ad a nukleinsavakra és kompatibilis a tömegspektrometriás (MS) detektálással. Murugaiah és munkatársai RPIP-HPLC módszert dolgoztak ki a bezárt siRNS koncentráció mérésére [11]. 60-65°C hőmérsékleten a lipid kettősréteg felbomlik és az siRNS duplex denaturálódik sense- és antisense száclak-
ra. Li és munkatársai hasonló méréseket végeztek ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (UHPLC) 80 °C-on [12].

MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

Morfológiai vizsgálatok a részecskeméret meghatározásánál leírt elektronmikroszkópos módszerekkel is elvégezhető. Kapoor és munkatársai [8] krio transzmissziós elektronmikroszkópiával (cryo-TEM) vizsgálták, hogy a kationos liposzómákból és siRNS-ből képződött lipoplexek

szerkezetét hogyan befolyásolja a kationos lipidszerkezet és a töltésarány.

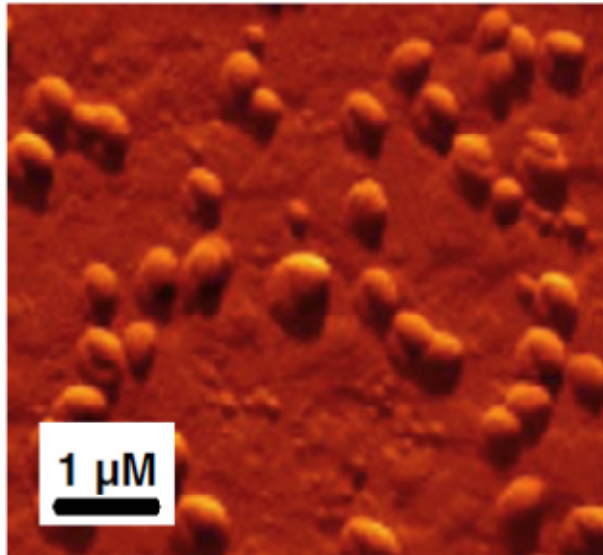
Az atomerő mikroszkópia (AFM) jól alkalmazható liposzómák morfológiai vizsgálatára, mert nem igényel minta-előkészítést és nincs szükség különleges atmoszférára. A technika lényege, hogy egy vékony, könnyen hajló konzolra szerelt, kis görbületes sugarú tűvel letapogatják a mintát. Amikor a tű hegye, amely egyetlen atomból áll, közel kerül a minta felszínéhez, megváltozik annak helyzete a fellépő erőhatások miatt. Az elhajlás detektálását lézerrel és fotodiódákkal végzik és egy visszacsatoló mechanizmus ennek megfelelően igazítja a tű minta feletti magasságát. A finom mozgásokat piezo-kristályok segítségével lehet előállítani. A végeredmény egy nagyfelbontású, háromdimenziós profil a vizsgált felszínről [13]. Schäfer és munkatársai [14] siRNS-t szállító liposzómák, poliplexek és lipopoliplexek méretét és szerkezetét vizsgálták AFM módszerrel. Garbuzenko és munkatársai [15] hagyományos, PEGilált- és kationos liposzómák, valamint kationos liposzóma siRNS komplexek alakját vizsgálták AFM technikával. A felvételek a 2. ábrán láthatók.

STABILITÁSI VIZSGÁLATOK

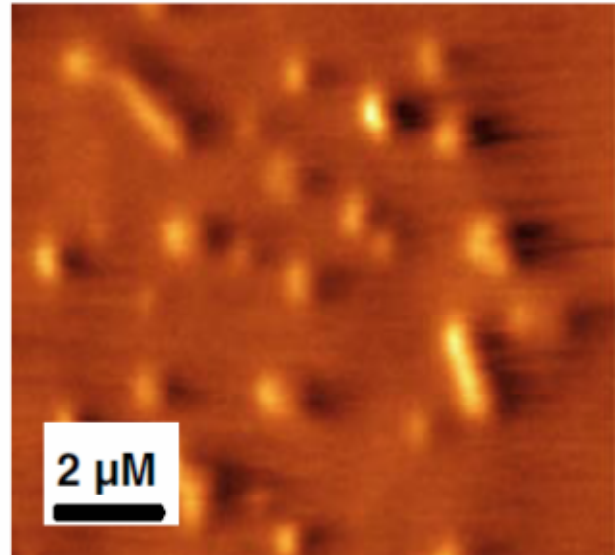
A liposzómális siRNS készítmények fizikai és kémiai hatásra destabilizálódhatnak. A fizikai destabilizációt jelzi a liposzómák méretének szignifikáns növekedése és aggregátumok képződése. A kémiai destabilizáció jele a bezárt siRNS szivárgása vagy a liposzóma teljes felbomlása, emellett bekövetkezhet a lipidek és a nukleinsavak degradációja is [8]. A lipid degradációt a hidrolízis és/vagy az oxidáció okozza. Savas vagy bázikus közegben a nukleinsavak hidrolízist szenvedhetnek.

A fizikai stabilitást a részecskeméret és a zéta-potenciál rendszeres mérésével lehet ellenőrizni az előzőekben leírt módszerekkel. A 3. ábrán egy általunk vizsgált liposzóma készítmény méreteloszlása látható, 90 napos tárolást követően. A felvételen látható, hogy az eredeti részecskék (46,7±2,9 nm) mellett megjelennek az aggregátumok (331,3±79,6 nm) is.

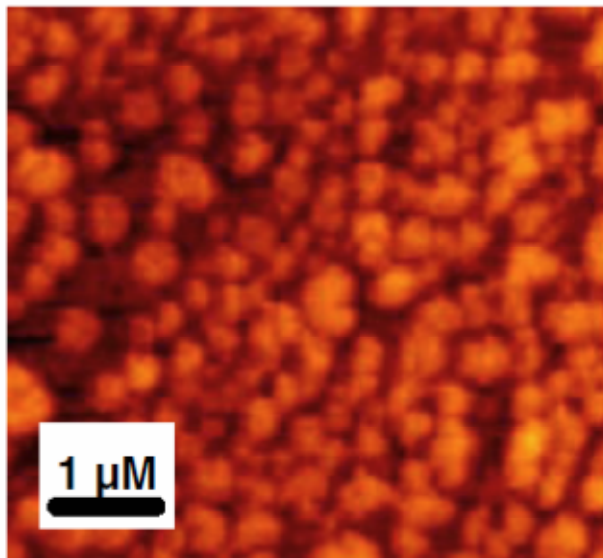
**Neutral
Conventional Liposomes**



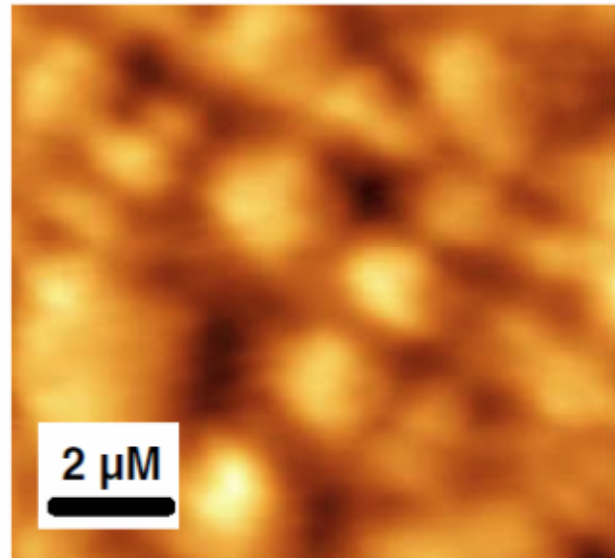
**Neutral
PEGylated Liposomes**



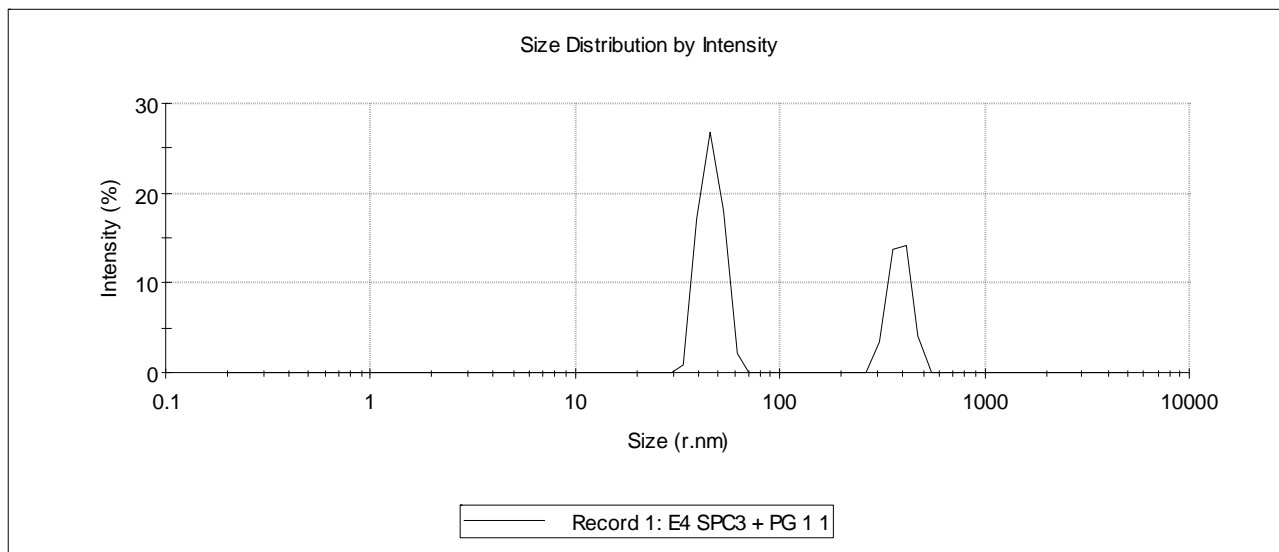
Cationic Liposomes



**Cationic
Liposomes with siRNA**



2. ábra Atomerő mikroszkóppal (AFM) készült képek hagyományos-, PEGilált- és kationos liposzómák, valamint kationos liposzóma siRNS komplexek alakjáról, Garbuzenko és munkatársai [15] szerint



3. ábra Liposzóma méreteloszlása DLS módszerrel mérve, Malvern Zetasizer Nano-ZS készüléken

Az extrém körülmények között, savas és bázikus közegben, vizsgált lipid degradáció hidrolízis- és oxidációs termékeinek mérésére a normál vagy fordított fázisú HPLC alkalmas, UV vagy porlasztásos fényszórás (ELS) detektálással. Zhong és munkatársai a liposzómák lipid degradációs profiljának tanulmányozására RP-HPLC-t használtak [16]. Murugaiah és munkatársai fordított fázisú, ionpár kromatográfiai (IPRP-HPLC) módszerrel követték a degradációt savas-, bázikus- és oxidatív körülmények között, valamint emelt hőmérsékleten (75 °C), a degradációs termékeket és a szennyező anyagokat pedig tömegspektrometriás (MS) detektorral azonosították [11].

KÖVETKEZTETÉSEK

A liposzómális szállítórendszerek hatékonyságának ellenőrzésére alkalmas karakterizálási módszerek fejlesztése párhuzamosan folyik a szállítórendszerek fejlesztésével, ezért szükséges a szakirodalom folyamatos figyelése. A módszerek akkor megfelelőek, ha reprodukálhatóak, pontosak és gyorsak.

Ha a liposzóma alapú kis interferáló RNS (siRNS) szállítórendszerek előállítása jól ellenőrzött körülmények között történik, és ha azok fizikai-kémiai jellemzőit optimalizálni tudjuk az alkalmazás sajátos igényeinek megfelelően, akkor megteremtjük egy biológiailag hatásos készítmény gyártásának lehetőségét.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A bemutatott tanulmány a TÁMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 jelű projekt részeként az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALMAK

- [1] Ramon, A-L., Bertrand, J-R., Malvy, C.: Delivery of small interfering RNA. A review and an example of application to a junction oncogene. *Tumori*, 2008, 94, 254-263.
- [2] Ledley F. D.: Non-viral gene therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1994, 5, 626-636.
- [3] Wu, S. Y., McMillan, N. A. J.: Lipidic Systems for In Vivo siRNA Delivery. *The AAPS Journal*, 2009, 11, 4, 639-652.
- [4] Gondi, C. S., Rao, J. S.: Concepts in in vivo siRNA Delivery for Cancer Therapy. *J. Cell. Physiol.*, 2009, 220(2), 285-291.
- [5] Hirsch, M., Ziroli, V., Helm, M. et al: Preparation of small amounts of sterile siRNA-liposomes with high entrapping efficiency by dual asymmetric centrifugation (DAC). *Journal of Controlled Release*, 2009, 135, 80-88.
- [6] Gomez-Hens, A., Fernandez-Romero, J. M.: The role of liposomes in analytical processes. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24, 1, 9-19.
- [7] Meyer, O., Roch, O., Elmlinger, D. et al: Direct lipid quantitation of cationic liposomes by reversed-phase HPLC in lipoplex preparation process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, 50, 353-356.
- [8] Kapoor, M., Burgess, D. J., Patil, S. D.: Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, ARTICLE IN PRESS
- [9] Santel, A., Aleku, M., Keil, O. és et al: A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endo-

- thelium. *Gene Therapy*, 2006, 13, 1222-1234.
- [10] *McCarthy S. M., Gilar, M., Gebler J.*: Reversed-phase ion-pair liquid chromatography analysis and purification of small interfering RNA. *Analytical Biochemistry*, 2009, 390, 181-188.
- [11] *Murugaiah, V., Zedalis, W., Lavine, G. et al.*: Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of two liposome-formulated short interfering RNA duplexes. *Analytical Biochemistry*, 2010, 401, 61-67.
- [12] *Li, Z., Schariter, J. A., Zhang, J. et al.*: Application of Ultra-high Performance Liquid Chromatography for Chemical Characterization of Liposome-based Therapeutic Small-interfering RNA. *American Pharmaceutical Review*, 2010, September/October, 101-110.
- [13] *Edwards, K. A., Baeumner A. J.*: Analysis of liposomes. *Talanta*, 2006, 68, 1432-1441.
- [14] *Schäfer, J., Höbel, S., Bakowsky, U. et al.*: Liposome-polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery. *Biomaterials*, 2010, 31, 6892-6900.
- [15] *Garbuzenko, O. B., Saad, M., Betigeri, S. et al.*: Intratracheal Versus Intravenous Liposomal Delivery of siRNA, Antisense Oligonucleotides and Anticancer Drug. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26, 2, 382-394.
- [16] *Zhong, Z., Ji, Q., Zhang, J. A.*: Analysis of cationic liposomes by reversed-phase HPLC with evaporative light-scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 51, 947-951.