

## 微脂球技術(Liposome technology)與 體外檢驗試劑組(in vitro diagnostic kits)的研發

清華大學化學系副教授 何佳安

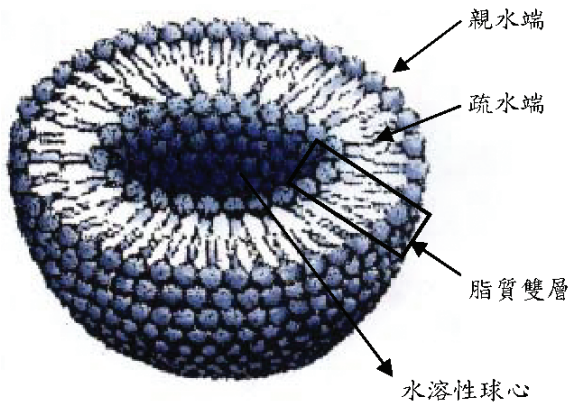
清華大學化學系博士班 林雍仁

西元 1965 年，微脂球由英國劍橋巴布拉漢研究中心(Babraham Institute)的科學家 Alec Bangham 及其研究團隊所發現[1]。1970 年代，微脂球首先被認為可以當做藥物載體，並進行動物活體實驗，隨即引起研究熱潮。但由於技術上之種種困難，難以達到實用的理想，1980 年代中期漸漸受到冷落。所幸仍有後進研究者鍥而不捨地研發改進，因此在 1990 年，第一個微脂球劑型藥物 Amphotericin B (Ambisome) 首獲愛爾蘭認可，臨床上被用於治療全身性黴菌感染。另一項微脂球配方的抗癌藥物(Lipo-Dox or Doxil)則在 1996 年首度獲准上市。微脂球型藥物傳送系統(Drug Delivery System, DDS)具備大幅增進現有藥物的療效與價值的潛力，因而深受學界及業界的重視。相較於傳統醫療的經血液循環、致使藥物分散於身體各器官之顧慮，liposomal DDS 具特定靶向功能，咸信可以增強特定藥物對於標的器官的療效，選擇性地殺滅癌細胞，並大幅減少副作用。在此同時，隨著生物技術之蓬勃與進步，微脂球在生物技術方面之應用倍受重視，微脂球的研究因而熱門起來。探討微脂球劑型的化療藥物的價值成為目前奈米生醫領域相當熱門的技術。

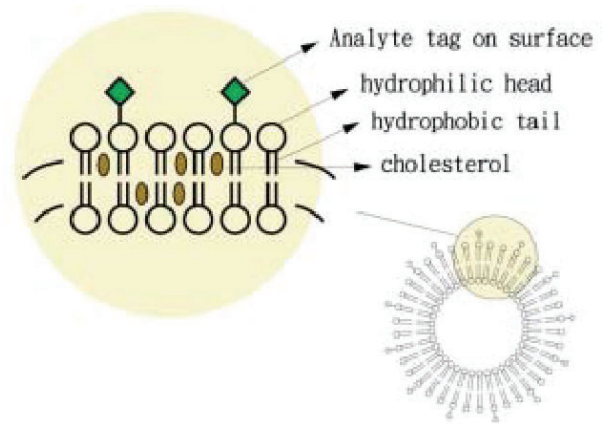
微脂球(liposome)是脂質空心微球，可均勻分佈於水溶液中。脂質雙層膜(lipid bilayers)主要由磷脂質分子所構成。其磷酸端為親水性；脂肪酸鏈為疏水性，構造與生物膜類似[2] (圖一)。因此早期，微脂球提供了科學家用來模擬細胞膜與膜蛋白(membrane protein)間交互作用之系統模式，研究細胞膜的滲透性、細胞膜的融合以及細胞膜與蛋白質的反應。也正因為微脂球之類細胞膜構造，加上具有生物相容性(biocompatible)和生物可分解性(bio-degradable)，因此被陸續應用於基因治療[3]及藥物傳遞[4,5]的臨床試驗，是美

國 FDA 少數被認可核准的藥物載體之一。水溶性物質或藥物可被包裹在微脂球球心溶液中；油溶性物質或藥物則可夾在脂雙層內。由於微脂球可同時當作水溶性物質或油溶性物質的載體，也因此更被廣泛使用在化妝品工業[6,7]及體外檢驗試劑的開發[10-20]。

微脂體依其大小、形狀不同而有各種名稱。依型態分類最常見者為：MLV (multilamellar vesicle, 多層微脂粒)，粒徑 0.4~3.5 $\mu\text{m}$ ，一顆微脂粒內包有數個同心球，有如洋蔥。LUV (large unilamellar vesicle, 單層大微脂粒)，粒徑 0.2~1 $\mu\text{m}$ 。SUV (small unilamellar vesicle, 單層小微脂粒)，粒徑 0.02~0.05 $\mu\text{m}$ 。各型微脂粒有其適用特性，MLV 有層層釋出包容物之特性(sustained release)；LUV 的包容性最大，可包含高分子水溶性物質；SUV 最小，可穿過血管壁。製作微脂球的方法，依據脂質分散(lipid dispersion)的模式可分為三大類：機械性分散(mechanical dispersion)、溶劑分散(solvent dispersion)以及界面活性劑溶解(detergent solubilization [1])。製備流程不外乎四步驟：溶解脂質、移除脂質溶液中有機溶劑、添加水溶性溶液、純化微脂球。機械性分散法之原理是將脂質溶解後去除溶媒形成脂薄膜，再將欲包裹於球心的水溶性物質加入，搖晃混合而成。此類技術中最常見的有薄膜法(film method)及冷凍-融解法(freeze and thaw method)。薄膜法則為 Bangham 用來製備生物膜模型—微脂球的方法。溶劑分散技術中最常見的方法有逆相蒸發法(reverse-phase evaporation method) [1, 14, 21]及溶劑注射法(solvent-injection method)。逆相蒸發囊泡(reverse-phase evaporation vesicles, REV) 多為異質性的單層大微泡，其直徑範圍由 100 至 1000 nm。直徑 150-200 nm 的 REVs 普遍用在微脂球免疫分



圖一 微脂球結構圖

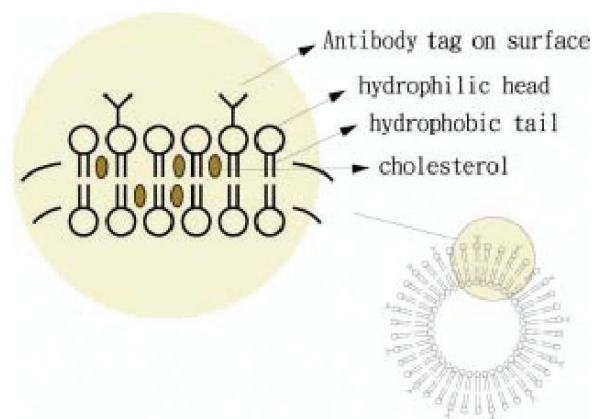


圖二 競爭型檢驗試劑用微脂球

析法上[22-23]。溶劑注射法則是將脂質先溶在有機溶劑(如：乙醚或乙醇)中，接著將之注入至水溶性溶液裡。所得到的單層小微泡有高體積的包覆能力[1, 24]。第三類為界面活性劑溶解(detergent solubilization)法，先將界面活性劑與磷脂質混合均勻而形成的微胞(micelles)溶液系統，後將界面活性劑從系統中移除，微脂球族群逐漸增加，最後進而結合合併成封閉式單一脂雙層(closed single-bilayer vesicles)的微脂球[1]。

在國內，由於整體投資環境回歸商業基本面，對生技產業的期待由高風險高技術的生技製藥業，逐漸轉向投入全球市場僅次於生技製藥業但回收期短、且易進入市場面的醫療器械設計與檢驗試劑等產業。2001 年全球檢驗試劑市場約為 330 億美元，預估每年將以 7% 以上成長。在檢驗試劑市場中，又以快速檢驗試劑成長最快達到 13%，成為現在及未來市場發展之主流之一。擁有強化訊號放大效果的微脂球於 1990s 年代首次被應用在體外檢驗試劑(IVD)的開發。

有別於酵素連結免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)需要更換試劑並耗時等待酵素與基質作用改變顏色以產生訊號[25-28]。微脂球免疫分析法利用微脂球包裹訊號物質，如螢光染劑或其他具光學活性或電化學活性的標識物，提供立即式訊號放大之量測。常用在微脂球免疫分析之螢光染劑有 carboxyfluorescein (CF) 及 sulforhodamine B (SRB) 兩種，可用紫外光可見光光譜儀(UV-VIS spectrophotometer)或螢光光譜儀(spectrofluorometer)偵測之[29]。通常一個好的標識物需具備高的螢光值或高莫耳吸收度、化學穩定性高及易



圖三 三明治型檢驗試劑用免疫微脂球

溶於較廣的 pH 範圍水溶液中等特性[23]。

在微脂球免疫分析法(liposome immunoassays)中，包裹標識物的微脂球的表面必須攜帶一個可進行免疫辨識反應(immunorecognition reaction)的分子，此分子可為分析物本身或與分析物相對應的抗體。一般來說，小分子抗原(small-molecular-weight target analyte)會先行與磷脂質共價鍵結，再與其他脂質混合以製備攜有抗原的微脂球(diagnostic liposomes)(見圖二)，這類的微脂球通常用來研發競爭型免疫分析法(competitive assay)。另一種則是將單株抗體(mAb)或多株抗體(pAb)連結在微脂球的表面，形成所謂的免疫微脂球(immunoliposomes: antibody-coupled liposomes)(見圖三)，此類的微脂球適用於三明治型免疫分析(sandwich assay)。

攜帶抗原或抗體的微脂球皆已被證實可成功地應用於連續式微脂球免疫分析系統(連續式流體注入微脂球免疫檢測系統，Flow Injection Liposome ImmunoAnalytical system, FILIA)及微

脂球型體外檢驗試劑組的開發(試紙型微脂球免疫檢驗, liposome immunomigration assay, LIA)。前者適合在實驗/檢驗室裡使用,以處理大批樣品;後者則適合在實驗室外做現場(on-site)快速偵測[31]。使用微脂球於試紙型體外檢驗試劑組的實例,包括偵測農藥殘留、環境毒物、病原菌、黃麴毒素及霍亂毒素的試紙型免疫檢測法(immunomigration strip format) [7, 12, 16-18, 26, 30, 32];而流體注入競爭型微脂球免疫法(Flow-injection competitive liposome immunoassay, FILIA)則已應用於量測藥物、農藥殘留、殺蟲劑殘留及福馬鐮孢毒素[14-15, 19-20, 25, 27-28, 31, 33]。

#### 參考文獻

- [1] A. D. Bangham, M. M. Standish, and G. Weissmann, *J. Mol. Biol.*, **13**, 253 (1965).
- [2] R. R. C. New (Ed), *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press: Oxford, U.K. (1990).
- [3] P. F. Lurquin, In *Liposome Technology: Entrapment of Drugs and Other Materials*, Vol. II, Chapter 8. G. Greroriadis (Ed), CRC Press: Boca Raton, FL, U.S.A. (1984).
- [4] P. Shum, J. M. Kim, D. H. Thompson, *Advanced Drug Delivery Reviews* **53**, 273 (2001).
- [5] D. Chen, D. L. Cole, G. S. J. Srivatsa, *Pharm. Biomed. Anal.* **22**, 791 (2000).
- [6] G. Betz, P. Nowbakht, R. Imboden, G. Imanidis, *Int. J. Pharm.* **228**, 147 (2001).
- [7] J. Röding, M. Ghyczy, *Seifen, Öle, Fette, Wachse*, **117**, 372 (1991).
- [8] H. A. H. Rongen, A. Bult, W. P. J. van Bennekom, *Immunol. Methods* **204**, 105 (1997).
- [9] R. J. Y. Ho, B. T. Rouse, L. Huang, *Biochem.* **25**, 5500 (1986).
- [10] S. G. Reeves, S. T. A. Siebert, M. A. Roberts, R. A. Durst, *Trends Anal. Chem.* **14**, 351 (1995).
- [11] A. K. Singh, S. H. Harrison, J. S. Schoeniger, *Anal. Chem.* **72**, 6019 (2000).
- [12] M. B. Esch, A. J. Baeumner, R. A. Durst, *Anal. Chem.* **73**, 3162 (2001).
- [13] L. Alfonta, I. Willner, D. J. Throckmorton, A. K. Singh, *Anal. Chem.* **73**, 5287 (2001).
- [14] J-a A. Ho, R. A. Durst, *Anal. Chimica Acta.* **414**, 51 (2000).
- [15] J-a A. Ho, R. A. Durst, *Anal. Chimica Acta.* **414**, 61 (2000).
- [16] J. A. Ho, R. D. Wauchope, *Anal. Chem.* **74**, 1493 (2002).
- [17] J-a A. Ho, H. W. Hsu, *Anal. Chem.* **75**, 4330 (2003).
- [18] S. Ahn-Yoon, T. R. DeCory, A. J. Baeumner, R. A. Durst, *Anal. Chem.* **75**, 256 (2003).
- [19] J-a A. Ho, H. W. Hsu, M. R. Huang, *Anal. Biochem.* **330**, 342 (2004).
- [20] J-a A. Ho, M. R. Huang, *Anal. Chem.* **77**, 3431 (2005).
- [21] F. Jr. Szoka, D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 4194 (1978).
- [22] D. Monroe, *Am. Clin. Prod. Rev.* **5**, 34 (1986).
- [23] D. J. Monroe, *Liposome Res.*, **1**, 339 (1990).
- [24] S. Batzri, E. D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 1015 (1973).
- [25] L. Locascio-Brown, A. L. Plant, V. Horvath, R. A. Durst, *Anal. Chem.* **62**, 2587 (1996).
- [26] C. S. Lim, J. N. Miller, J. W. Bridges, *Anal. Chim. Acta* **14**, 183 (1980).
- [27] L. Locascio-Brown, A. L. Plant, R. Chesler, M. Kroll, M. Ruddel, R. A. Durst, *Clin. Chem.* **39**, 386 (1993).
- [28] W. T. Yap, L. Locascio-Brown, A. L. Plant, S. J. Choquette, V. Horvath, R. A. Durst, *Anal. Chem.* **63**, 2007 (1991).

- [29] B. Axelsson, H. Ericksson, C. Borrebaeck, B. Mattiasson, H. O. Sjögren, *J. Immunol. Methods.* **41**, 351 (1981).
- [30] R. A. Durst, S. T. A. Siebert, S. G. Reeves. *Biosensors and Bioelectronics* **8**, xiii-xv. (1993).
- [31] M. Lee, R. A. Durst, *J. Agric. Food Chem.* **44**, 4032 (1996).
- [32] V. Subramanian, L. C. Wu, M. R. Huang, J-a A. Ho, *Anal. Chem.* **78**, 1115 (2006).
- [33] J-a A. Ho, S. C. Zeng, M. R. Huang, H. Y. Kuo, *Anal. Chimica Acta.* **556**, 127 (2006).