

盐酸洛拉曲克脂质体的制备及其质量考察 *

陈斯泽¹ 陈雪梅² 汪森明³ 张积仁^{3Δ}

(1 广东药学院附属第一医院肿瘤科 广东广州 510080 2 南方医科大学热带医学与公共卫生学院 广东广州 510515 ;

3 南方医科大学附属珠江医院肿瘤中心 广东广州 510282)

摘要 目的 制备盐酸洛拉曲克脂质体并考察其理化特性。方法 采用薄膜挤压-硫酸铵梯度法制备盐酸洛拉曲克脂质体,透射电镜及激光粒度分析仪分别观察和检测其粒径大小及分布,通过紫外分光光度法测定包封率及评估体外释药试验。结果 制备的盐酸洛拉曲克脂质体包封率达 83.6%±2.37%,粒径 103.5±26nm 且分布均匀。24h 体外释放实验结果提示约有 66.5%的盐酸洛拉曲克从脂质体释放出来。结论 新制备的盐酸洛拉曲克脂质体粒径大小均匀,包封率尚有提高空间,具有体外缓慢释药的特性。

关键词 盐酸洛拉曲克 脂质体 粒径 包封率

中图分类号 R917 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)09-1779-03

Preparation and Quality of Nolatrexed Dihydrochloride Liposomes*

CHEN Si-ze¹, CHEN Xue-Mei², Wang Sen-Ming³, Zhang Ji-Ren^{3Δ}

(1 Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China;

2 School of Public Health and Tropic Medicine, South Medical University, Guangzhou, 510515, China;

3 Department of Oncology, The Affiliated Second Hospital of Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT Objective: To prepare nolatrexed dihydrochloride liposomes (NDL) and detect their correlative parameters. **Methods:** The nolatrexed dihydrochloride liposomes were prepared by film dispersion-extrusion combined with the ammonium sulphate gradients method. The UV detector with Sephadex G50 was utilized for the determination of the drug entrapping efficiency of liposomal nolatrexed dihydrochloride. The disposition of particle diameter was investigated by transmission electron microscope(TEM) and laser particle analyzer And the entrapment efficiency and characteristic of drug release in vitro were detected by UV method. **Results:** The mean diameter of the nolatrexed dihydrochloride liposomes was 103.5±26 nm, with the entrapping efficiency of 83.6 %±2.37%. From the drug release experiment, about 66.5% nolatrexed dihydrochloride was released from the liposome after 24 hours. **Conclusion:** The new prepared liposomes have good characteristics both in distribution and size, and it also can reach the purpose of slow-release effectiveness in-vitro, but the entrapping efficiency percentage still need to be further lifted.

Key words: nolatrexed; liposome; entrapping efficiency; particle diameter

Chinese Library Classification: R917 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)09-1779-03

盐酸洛拉曲克(nolatrexed dihydrochloride)是根据胸苷合成酶(thymidylatesynthase,TS)催化活性中心三维结构设计并合成的特异性抑制剂^[1,2]。因干扰 DNA 合成,阻止细胞分裂增殖而发挥抗肿瘤作用。初步临床研究已证实其对肝癌、头颈癌、胰腺等多种实体瘤有较好临床疗效^[3,4]。盐酸洛拉曲克通过被动扩散进入细胞,且在细胞内半衰期非常短,必须持续静脉给药来维持其对癌细胞的毒性,这种毒性同时对正常组织也起作用,最常见的不良反应包括皮疹、粘膜炎、中性粒细胞减少和血小板减少等^[5-9]。这种剂量限制性毒性影响临床疗效发挥。脂质体(liposomes)能延长药物在血流中的时间,及对肿瘤组织具有相对靶向性和缓释性,降低用药剂量,提高疗效,降低毒副作用^[10,11]。利用脂质体作为盐酸洛拉曲克的载体,可弥补了盐酸洛拉曲克的部分不足。为此我们研制盐酸洛拉曲克脂质体并对其理化特性进行初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

氢化大豆磷脂(HSPC, Lipoid 公司);胆固醇(Chol, Sigma 公司);盐酸洛拉曲克(康辰医药发展有限公司)。Sephadex G50 (Pharmacia)、聚碳酸酯核微孔滤膜(Nuclepore(r)0.2、0.4、0.8 μm, Whatman)、截留分子量 2000 的透析袋(美国)。真空旋转蒸发器(ZFO86A,上海);探针超声(JY88-II,宁波新芝科器研究所);紫外分光光度计(BECKMAN DU-600,美国);激光粒度分析仪(Malvern-3000HS,英国);透射电镜(GEOL-120EX, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 空白脂质体制备(薄膜挤压法^[12,13])按摩尔比 1:1 精密称取 HSPC、Chol、置梨形瓶中,用氯仿溶解,真空旋转蒸发器旋转真空蒸发成膜(50℃),将 120mmol/L 硫酸铵溶液加至脂膜

* 基金项目 全军医药卫生科研指令性课题, No. 04T101

作者简介 陈斯泽 硕士 主治医师 从事肿瘤化疗及肿瘤介入治疗 chen_size@hotmail.com

Δ通讯作者 张积仁 博士教授 主任医师 博导 zhangjiren@hotmail.com

(收稿日期 2011-03-03 接受日期 2011-03-27)

中,探针超声 10min 得空白脂质体混悬液。将此混悬液于 60℃ 左右过聚碳酸酯核微孔滤膜 0.2、0.4、0.8μm 各 3 次,得空白脂质体。

1.2.2 主动载药 (硫酸铵梯度法^[14-17]) 将此空白脂质体溶液置于透析袋中,以生理盐水为透析液,透析 5 次,每次 8 小时。精取盐酸洛拉曲克 20mg 溶于水中,将此溶液加入空白长循环脂质体混悬液中,置 60℃ 水浴箱中放置 30min,不时振摇,即得盐酸洛拉曲克脂质体。

1.2.3 脂质体的形态、粒径和及分布的考察 适量生理盐水稀释脂质体后,用激光粒度分析仪检测其粒径大小及分布,取用生理盐水稀释的盐酸洛拉曲克脂质体,滴至载玻片上,以 1% 磷钨酸负染色后,再滴至专用铜网上,自然挥干,使粒子在铜网上浓缩沉积,用透射电镜观察并拍片记录。

1.2.4 最大吸收波长的选择 将盐酸洛拉曲克及辅料配成一定浓度的溶液行紫外扫描图谱,在 200-400nm 范围内发现盐酸洛拉曲克在 298nm 下有最大吸收,且在此波长下,磷脂和胆固醇的吸收极小,低于 5%,所以选定 298nm 为检测波长,并做空白脂质体以消除磷脂和胆固醇的干扰。

1.2.5 盐酸洛拉曲克标准曲线的绘制 取空白脂质体 0.1mL,加生理盐水稀释至 5 mL,精密称取盐酸洛拉曲克 400mg,加生理盐水溶解并定容至 100 mL 量瓶中,作为贮备液。空白脂质体稀释液 0.5 mL,用混合溶媒(10%tritonX-100:乙醇:水=1:14:35)溶解,加一定量贮备液,用生理盐水定容,配制成盐酸洛拉曲克浓度分别为 2.5、5.0、7.5、10、15 和 20mg/L 标准溶液,用紫外分光光度计于 298nm 测定吸光度,用空白脂质体作对照。以吸光度 A 对浓度 C (mg/L)进行回归,求回归方程。

1.2.6 脂质体包封率的测定 取脂质体约 0.2mL,加在 Sephadex G50 葡聚糖凝胶柱上,用自制生理盐水以 1mL/min 的流速洗脱,每份收集 3mL。用紫外分光光度计检测流份,流出的顺序依次为空白洗脱液、脂质体、空白洗脱液、游离盐酸洛拉曲克、空白洗脱液。收集合并脂质体流份,加入适量混合溶媒,摇匀;另取包封过的脂质体,加混合溶媒。于 298nm 处测吸收度,按下式计算包封率

$$E\% = W1/W2 \times 100\%$$

E% 为包封率, W1 为经柱分离后的盐酸洛拉曲克脂质体含药量, W2 为未经柱分离的盐酸洛拉曲克脂质体含药量。

1.2.7 脂质体体外释药性能测定 制备好的洛拉曲克脂质体混悬液 10ml 至透析袋中,置于 50ml 磷酸盐缓冲液中,37℃,磁力搅拌 100rpm,定时吸取透析液 200μl 测定吸光度,并按标准曲线方程计算累积释药百分率。重复上述试验共 3 次,结果取平均值用 Origin7.0 作图。

2 结果

2.1 脂质体的形态、粒径和及分布的考察

用适量生理盐水稀释 NDL 后,用激光粒度分析仪检测,其粒径大小为 103.5± 26nm,粒径分布均匀,且范围较窄,其粒径分布图见图 1。透射电镜观察并拍片可见 NDL 呈圆球状,粒径与粒径分析仪检测结果相当,大小均匀,见图 2。

2.2 盐酸洛拉曲克回归方程建立

盐酸洛拉曲克回归方程为 $C = 31.629A - 0.083$ ($r = 0.9999$, $P < 0.001$)。此方法所建立的回归方程,回收率达 98.5%,RSD 为 1.87%。

2.3 脂质体包封率的测定

取 3 个不同批次样品,结果测得脂质体的包封率为 83.6% ± 2.37%。

2.4 脂质体体外释药性能测定

体外释放度实验结果提示,透析 24h 后,约有 66.5% 的盐酸洛拉曲克从脂质体释放出来(图 3)。

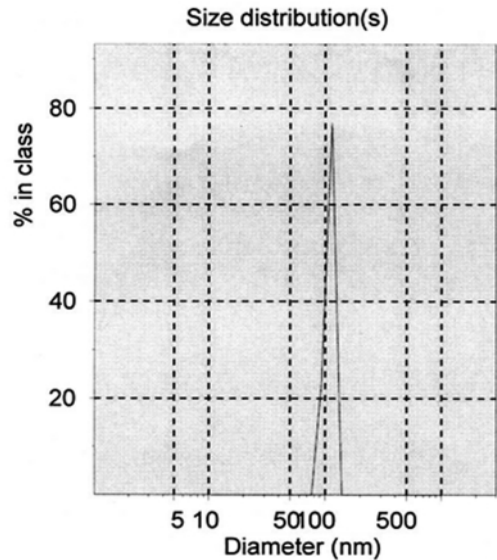


图 1 盐酸洛拉曲克脂质体粒径分布

Fig.1 Size distribution curve of nolatreted dihydrochloride liposomes

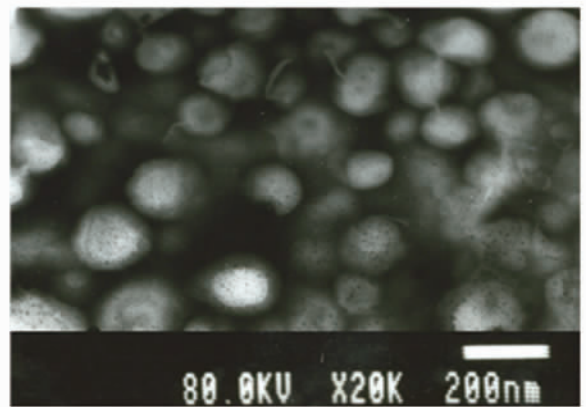


图 2 盐酸洛拉曲克脂质透射电镜相片(× 20K)

Fig.2 TEM photograph of nolatreted dihydrochloride liposomes(× 20K)

3 讨论

普通磷脂随着工艺温度的升高,磷脂的水解速率也随之增大,尤其是高于 53℃ 磷脂水解更快,时间一长,溶血卵磷脂的量就多,过高将导致溶血卵磷脂超标,产品不合格。而本研究选用的 99% 纯度 HSPC 是经过氢化的大豆磷脂,属于饱和磷脂,不会氧化,加上胆固醇后,相转变温度可能升高。另外加入一定比例量的胆固醇,起到固化类脂双分子层的作用,可固化膜,减少膜的流动性,改善药物的内相渗漏,也可以防止脂质体的氧化,增强膜对超声震荡的稳定性,以及增强制剂在血浆中的稳定性。

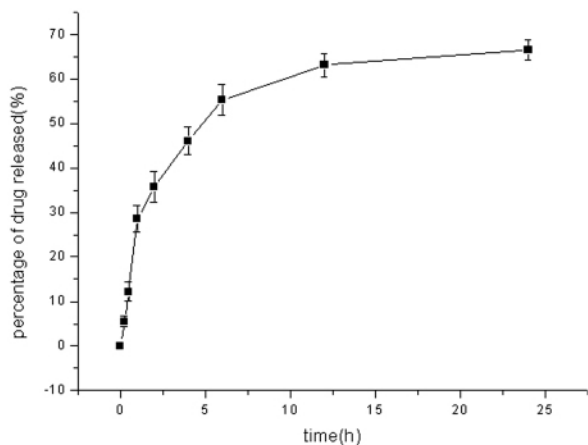


图 3 脂质体外释药曲线

Fig.3 Release curve in vitro of nolatrexed dihydrochloride liposomes

本研究选用薄膜挤压法结合硫酸铵梯度法,使脂质体粒子小而均匀,且载药量较高。由于本实验未购有粒径挤压器,为了达到整粒的目的,采用探针超声协助整粒。采用超声探头的弊病在于:长时间使用发热,这样对于温度敏感药物和磷脂都有破坏作用,而且探头的金属在超声时容易脱屑,用滤膜过滤时,滤膜表面往往会有一层金属屑。本实验采用超声法属实验室方法,不适合工业化要求,有条件最好采用高压均质的办法,可考虑 LIPEX 的 EXTRUDER。

用激光粒度仪及透射电镜检测盐酸洛拉曲克脂质体的粒径及分布,结果显示其平均粒径为 103.5nm,且分布良好。脂质体粒径的大小影响其体内稳定性。Yokoyama M 等^[18]认为由于肿瘤生长迅速,其毛细管不连续,存在 100nm 左右的小窗,小于 100nm 的纳米粒易从血管中溢出而达到肿瘤间质,从而可以在肿瘤部位蓄积,对于粒径为几个纳米到小于 200nm,粒子表面带负电或电中性的水溶性的高分子物质、纳米粒和胶束具有 EPR 效应,即增加渗透和滞留效应。大的脂质体缺乏血管通透性,不能通过肝血管的细胞间隙易被网状内皮系统吞噬,小于 150nm 的脂质体可以减少肝脾摄取。本文所测脂质体粒径基本能满足要求,但如达到 80-100nm 则效果更佳。

本实验脂质体包封率 83.6%左右,基本达到 2005 版中华人民共和国药典要求,包封率不得低于 80%,但与同类上市抗癌药物脂质体相比,尚有一定差距。鉴于目前为实验尝试,如进一步改善实验设备及配方,定能开发出更完善的洛拉曲克脂质体剂型。

盐酸洛拉曲克为抗代谢类肿瘤化疗药物,是具有我国自主知识产权的国家一类抗肿瘤新药。目前该药在我国 Ⅲ期临床试验尚未结束。在此药尚未上市之前,我们研制出能弥补盐酸洛拉曲克本身缺点的脂质体制剂,扬长避短,更有助于发挥抗癌新药的功效。

参考文献(References)

[1] Stout TJ, Stroud RM. The complex of the anti-cancer therapeutic, BW1843U89, with thymidylate synthase at 2.0 Å resolution: Implication for a new mode of inhibition[J]. Structure, 1996,4:67-77

[2] Rustum YM, Harstrick A, Cao S, et al. Thymidylate synthase inhibitors in cancer therapy: direct and indirect inhibitors [J]. J Clin Oncol, 1997,15:389-400

[3] Schiffer CA, Clifton IJ, Davisson VJ, et al . Crystal structure of human

thymidylate synthase: a structural mechanism for guiding substrates into the active site[J]. Biochemistry, 1995,34:16279-16287

[4] Stuart K, Tessitore J, Rudy J, et al.A Phase II trial of nolatrexed dihydrochloride in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Cancer, 1999,86(3):410-414

[5] Sakoff JA, Howitt IJ, Ackland SP, et al. Serine/threonine protein phosphatase inhibition enhances the effect of thymidylate synthase inhibition[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2004,53:225-232

[6] Rafi I, Boddy AV, Calvete JA, et al. Preclinical and phase I clinical studies with the nonclassical antifolate thymidylate synthase inhibitor nolatrexed dihydrochloride given by prolonged administration in patients with solid tumors[J]. J Clin Oncol, 1998,16(3):1131-1141

[7] Hughes AN, Rafi I, Griffin MJ, et al. Phase I studies with the nonclassical antifolate nolatrexed dihydrochloride (AG337, THYMITAQ) administered orally for 5 days[J]. Clin Cancer Res, 1999,5(1):111-118

[8] Jodrell DI, Bowman A, Rye R, et al . A phase I study of the lipophilic thymidylate synthase inhibitor Thymitaq (nolatrexed dihydrochloride) given by 10-day oral administration [J]. Br J Cancer, 1999,79(5-6): 915-920

[9] Estlin EJ, Pinkerton CR, Lewis IJ, et al. A phase I study of nolatrexed dihydrochloride in children with advanced cancer. A United Kingdom Children's Cancer Study Group Investigation[J]. Br J Cancer, 2001,84(1):11-18

[10] 陆彬主编.药物新剂型与新技术[M].北京:人民卫生出版社,1998: 133

Bin Lu. New techniques and new dosage forms of drugs[M]. Beijing : people's medical publishing house, 1998:133

[11] Szoka JR. The future of liposome drug delivery [J]. Biotechnol & AppliedBiochem, 1990, 12:496

[12] Kallinteri P, Fatouros D, Klepetsanis P et al. Arsenic trioxide liposomes: encapsulation efficiency and in vitro stability [J]. J Liposome Res, 2004,14(1-2):27-38

[13] Verreck G, Vandecruys R, De Conde V, et al. The use of three different solid dispersion formulations--melt extrusion, film-coated beads, and a glass thermoplastic system--to improve the bioavailability of a novel microsomal triglyceride transfer protein inhibitor [J]. J Pharm Sci, 2004, 93(5):1217-1228

[14] Maswadeh H, Demetzos C, Dimas K, et al. Accumulation of vinblastine into transfersomes and liposomes in response to a transmembrane ammonium sulfate gradient and their cytotoxic/cytostatic activity in vitro[J]. Anticancer Res, 2001,21(4A):2577-2583

[15] Abra RM, Bankert RB, Chen F, et al. The next generation of liposome delivery systems: recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients [J]. J Liposome Res, 2002, 12(1-2):1-3

[16] Abraham SA, Edwards K, Karlsson G, et al. An evaluation of transmembrane ion gradient-mediated encapsulation of topotecan within liposomes[J]. J Control Release, 2004,96(3):449-461

[17] Li C, Cui J, Li Y, et al.Copper ion-mediated liposomal encapsulation of mitoxantrone: the role of anions in drug loading, retention and release. Eur J Pharm Sci, 2008,34(4-5):333-344

[18] Yokoyama M. Okano T. Targeting of anti-cancer drugs with nano-sized carrier system [J]. Tippo Rinsho-Japanese-Journal of Clinical Medicine, 1998,56(12):3227-3234