

酒石酸长春氟宁脂质体的体内外评价

邹伟伟^{1,2}, 王栋海^{1,2}, 孙春艳², 韩景宾², 尹青², 杨清敏^{1,2}, 王晶翼^{1,2*}

(1. 山东省注射用微粒给药新技术重点实验室, 山东 济南 250100; 2. 齐鲁制药有限公司药物研究院, 山东 济南 250100)

摘要: 采用 pH 梯度法制备两种不同药脂比的酒石酸长春氟宁脂质体 (vinflunine tartrate-loaded liposomes, VT-L)。运用激光粒度仪考察了脂质体的粒径分布和 zeta 电位; 阳离子交换树脂-离心法测定了包封率; 以酒石酸长春氟宁注射液 (vinflunine tartrate injection, VT-I) 为对照, 比较了不同药脂比的 VT-L 对裸鼠体内肿瘤抑制和毒性的情况。结果显示, 药脂比为 1:5 和 1:10 的 VT-L 平均粒径分别为 124.6 和 128.3 nm, zeta 电位分别为 -25.3 和 -22.8 mV, 包封率分别为 94.46% 和 97.31%。两种药脂比的 VT-L 对人非小细胞肺癌 A549 裸鼠移植瘤的抗肿瘤效应明显优于 VT-I, 毒性低于 VT-I。而两种药脂比的 VT-L 的抗肿瘤效应和毒性无显著差别。

关键词: 酒石酸长春氟宁; 脂质体; 包封率; 毒性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1515-05

Characterization of vinflunine tartrate liposomes *in vitro* and *in vivo*

ZOU Wei-wei^{1,2}, WANG Dong-hai^{1,2}, SUN Chun-yan², HAN Jing-bin², YIN Qing²,
YANG Qing-min^{1,2}, WANG Jing-yi^{1,2*}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Microparticle Drug Delivery Technology, Jinan 250100, China;

2. Research and Development Division, Qilu Pharmaceutical Co., Ltd, Jinan 250100, China)

Abstract: Vinflunine tartrate-loaded liposomes (VT-L) with two drug-to-lipid ratios were prepared by pH gradient method. Vesicle size and zeta potential were determined by the Zetasizer Nano ZS. Entrapment efficiency was evaluated by cation exchange resin centrifugalization method. The toxicity and tumor inhibition to nude mouse administrated by VT-L with different drug-to-lipid ratios were investigated and compared with the vinflunine tartrate injection (VT-I). The results showed that the mean particle size, zeta potential and entrapment efficiency of the VT-L with drug-to-lipid ratios of 1:5 and 1:10 were 124.6 nm and 128.3 nm, -25.3 mV and -22.8 mV, 94.46% and 97.31%, respectively. The VT-L with two different drug-to-lipid ratios has significantly higher anti-tumor effect to nude mouse transplanted human non-small cell lung carcinoma A549 and lower toxicity than VT-I. While there were no significant differences in anti-tumor effect and toxicity between VT-L with two different drug-to-lipid ratios.

Key words: vinflunine tartrate; liposome; entrapment efficiency; toxicity

酒石酸长春氟宁 (vinflunine tartrate, VT) 是由法国 Pierre Fabre 公司开发的一种新型的半合成长春花碱, 通过抑制微管蛋白的细胞增殖发挥其抗肿瘤作用, 用于治疗膀胱癌、非小细胞肺癌、乳腺癌和卵

巢癌等。VT 与酒石酸长春瑞滨的区别在于 C-20' 位上由两个氟原子取代两个氢原子^[1,2], 结构式见图 1。在人和鼠类 13 种肿瘤模型的体外抗癌实验中发现, VT 比酒石酸长春瑞滨具有更好的抗癌活性和较小的神经毒性的特点^[3]。然而该药仍存在一定的剂量限制性毒性反应^[4]。脂质体作为一种靶向给药剂型, 可改变药物的体内分布, 降低药物的毒性及不良反应, 提高药物治疗指数^[5]。本实验首次制备了酒石酸长春氟

收稿日期: 2011-06-03.

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项资助项目 (2010ZX09401-302-4-2).

*通讯作者 Tel: 86-531-83129968, Fax: 86-531-83126688,

E-mail: jingyi.wang@qilu-pharma.com

宁脂质体 (VT-L), 并对其进行了系统的评价, 国内外尚未见报道。

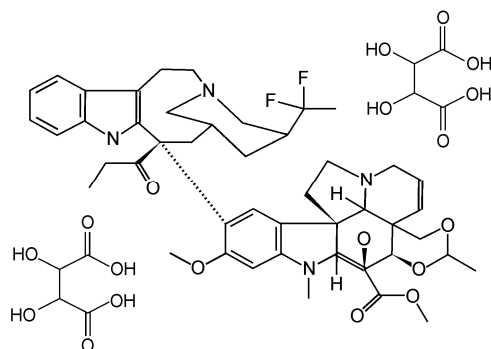


Figure 1 Structure of vinflunine tartrate (VT)

材料与方法

仪器 M-110EH 微射流纳米均质机 (Microfluidics); Waters 515-717-2487 高效液相色谱仪 (Waters 公司); Nano-ZS 激光粒子测定仪 (英国马尔文公司); 切相流超滤器 (Vivaflow200, 德国赛多利斯公司); YN-10 Ultracel 超滤膜 (Millipore 公司); HEMAVET 950FS 动物专用血球分析仪 (美国 DREW 公司)。

药品与试剂 VT (齐鲁制药有限公司, 批号: 20100724); 酒石酸长春氟宁注射剂 (自制, VT-I, 规格: 10 mg·mL⁻¹, 批号: 20100911); 氢化大豆卵磷脂 (SPC-3, 德国 Lipoid GmbH 公司, 批号: 256310-011015); PEG2000-DSPE (日本油株式会社, 批号: M86563); 胆固醇 (南京新百药业有限公司, 批号: 081202); 柠檬酸 (湖南尔康制药有限公司, 批号: 20090901); 磷酸三钠 (天津广成化学实际有限公司, 批号: 201009); 蔗糖 (湖南尔康制药有限公司, 批号: 20100401); L-组氨酸 (上海味之素氨基酸有限公司, 批号: 09HBA003); 药用无水乙醇 (天津市广成化学试剂有限公司); 甲醇为色谱纯; 其他试剂为分析纯。

动物 Balb/c-nu 裸小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体重 18~20 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证 SCXK (京) 2009-0004, 实验动物使用许可证 SYXK (鲁) 2006-0065, 饲养于 IVC 中。

VT-L 制备 采用 pH 梯度法制备两种不同药脂比的 VT-L。称取氢化大豆磷脂 3.0 g、胆固醇 0.6 g、PEG2000-DSPE 0.3 g 溶于适量无水乙醇, 60 °C 水浴加热得到澄清溶液, 旋蒸除去大部分乙醇, 采用 30 mL 柠檬酸缓冲液 (0.3 mol·L⁻¹, pH 4.0) 60 °C 水化 20 min, 进一步除去乙醇及泡沫, 经过微射流仪处理 (5 000 psi 2 个循环, 10 000 psi 4 个循环) (1 psi =

6.895 kPa), 形成半透明的脂质体混悬液, 即空白脂质体。测定空白脂质体中的氢化大豆磷脂浓度。在上述空白脂质体中加入适量 0.5 mol·L⁻¹ 磷酸三钠缓冲液, 使空白脂质体的外水相 pH 为 7.0。配制 20 mg·mL⁻¹ 的 VT 水溶液, 量取一定量的空白脂质体与 VT 水溶液混合, 使其药脂比分别为 1:5 和 1:10 (VT: 氢化大豆磷脂, w/w), 于 40 °C 搅拌孵育 20 min。之后采用切向流超滤器分别将以上两种不同药脂比的 VT-L 的外水相置换为 100 mg·mL⁻¹ 蔗糖/1.55 mg·mL⁻¹ 组氨酸溶液, 置换体积 > 4 倍脂质体体积。

VT-L 粒径分布和 zeta 电位的测定 取脂质体适量, 以注射用水稀释 10 倍, 用激光粒度仪检测其粒径分布和 zeta 电位。

VT-L 含量测定 采用高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 法测定 VT-L 中 VT 的含量。精密量取 VT-L 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加入 10% Triton X-100 乙醇溶液 10 mL 破膜^[6], 以流动相稀释并定容。按外标法计算供试品中 VT 含量。色谱条件: 色谱柱 SupelcosilTM ABZ+PLUS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国 Supelco 公司); 流动相: 甲醇/0.05 mol·L⁻¹ 醋酸铵 (用醋酸调 pH 值至 5.5) 为 53:47; 柱温为 30 °C; 检测波长 230 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL。系统适用性实验: 理论塔板数按 VT 峰计算应不低于 2 000, VT 与脂质体中的辅料峰分离度应 > 2.5。

VT-L 包封率的测定 采用阳离子交换树脂离心法^[7]测定所制备 VT-L 的包封率。取新鲜制备的不同药脂比的 VT-L 100 μL 各 2 份。1 份置于 10 mL 量瓶中, 先加入 10% Triton X-100 乙醇溶液破膜, 再以流动相定容至刻度, 摇匀, HPLC 法测定脂质体的总药量 ($W_{总}$)。另一份上样于阳离子交换树脂柱, 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min; 继续加 100 μL 重蒸水于柱顶端, 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min 洗脱, 连续操作 3 次, 合并洗脱液于 10 mL 量瓶中, 先加入 10% Triton X-100 乙醇溶液破膜, 再以流动相定容至刻度, 摇匀, 以 HPLC 法测定峰面积, 计算脂质体内部药量 ($W_{内}$)。包封率根据公式 $EE\% = W_{内} / W_{总} \times 100\%$ 计算, 每个样品如法平行操作 3 次求平均值。

VT-L 稳定性考察 将两种药脂比的 VT-L 溶液于 4 °C 条件下放置, 分别于 0、1、2、3 和 6 个月取样后测定脂质体包封率和平均粒径变化情况。

VT-L 药效学与毒理学实验 无菌条件下取生长良好的非小细胞肺癌系 A549 肿瘤组织, 切割成 2.0 mm 左右的均匀小块, 用套管针每只裸鼠右侧腋窝皮

下接种一块, 制备移植瘤模型, 待肿瘤生长至约 270 mm³ 时按肿瘤体积大小随机分组, 分别为空白脂质体组 (blank liposome, B-L)、阴性对照组 (negative control, N-C)、VT-I 组、VT-L-1 组 (药脂比 1:10) 和 VT-L-2 组 (药脂比 1:5)。各治疗组均按照 q3d×5 (每 3 天给药 1 次, 连续给药 5 次) 静脉注射给予 20 mg·kg⁻¹ (以 VT 计算), B-L 组同法给予等体积的 B-L, N-C 组给予等体积的 5% 葡萄糖注射液。于给药后开始每周 2~3 次测量瘤径, 考察各组肿瘤体积动态变化, 并记录体重、一般状态等相关毒性指标。绘制小鼠动态体重变化曲线, 记录动物死亡情况, 实验结束后处死动物, 称取瘤重 (tumor weight, TW)。相对体重 (relative weight, RW) 的计算公式为: $RW = W_t / W_0 \times 100$ 。其中 W_0 为给药前测量的裸鼠体重, W_t 为给药后每次测量时的裸鼠体重。肿瘤体积 (tumor volume, TV) 的计算公式为: $TV = 1/2 \times a \times b^2$, 其中 a 、 b 分别表示肿瘤长径和短径。相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV) 的计算公式为: $RTV = V_t / V_0$ 。其中 V_0 为给药前测量的肿瘤体积, V_t 为给药后每次测量时的肿瘤体积。以相对肿瘤生长抑制率 (relative tumor inhibition, RTI) 为动态观察的主要指标, 计算公式为: $RTI = (1 - T_{RTV} / C_{RTV}) \times 100\%$, T_{RTV} : 治疗组 RTV; C_{RTV} : 阴性对照组 RTV, $RTI < 40\%$ 为无效, $RTI \geq 40\%$, 且统计学处理 $P < 0.05$ 为有效; $RTV < 1$ 时界定为肿瘤发生消退 (即治疗后肿瘤体积小于初始给药体积)。

统计方法 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 SPSS 11.0 进行方差分析 (One-Way ANOVA), 进一步应用 q 检验比较组间差异。

结果

1 VT-L 的理化性质

1.1 粒径分布和 zeta 电位 经测定, 药脂比 1:5 和 1:10 的 VT-L 的平均粒径分别为 124.6 和 128.3 nm, zeta 电位分别为 -25.3 和 -22.8 mV。

1.2 包封率及载药量 经测定药脂比 1:5 和 1:10 的 VT-L 的包封率分别为 94.46% 和 97.31%, 药物质量浓度分别为 5.20 和 3.27 mg·mL⁻¹。

2 VT-L 的稳定性

VT-L 在 4 °C 条件下放置 6 个月后稳定性良好, 粒径、包封率均无明显改变 (图 2、图 3)。

3 VT-L 药理和毒理

3.1 VT-L 对人非小细胞肺癌 A549 裸鼠移植瘤的抑制作用 经过 q3d×5 给药期及 20 天的停药期观察,

VT-I 组各时间点 RTI 均低于 40%, 实验结束时 TW 与 N-C 组无显著差异, 表明 VT-I 对人非小细胞肺癌 A549 裸鼠移植瘤生长抑制不明显; VT-L-1 组和 VT-L-2 组各时间点 RTV 均显著低于 VT-I 组 ($P < 0.01$), 且肿瘤发生明显消退 ($RTV < 1$), 实验结束时 TW 明显低于 VT-I 组和 N-C 组, RTI 显著高于 VT-I 组, 且二者于给药结束后 RTI 仍高于 40%。另外, 结果显示 VT-L-1 与 VT-L-2 组间各药效学指标无显著差异 ($P > 0.05$) (图 4, 表 1)。

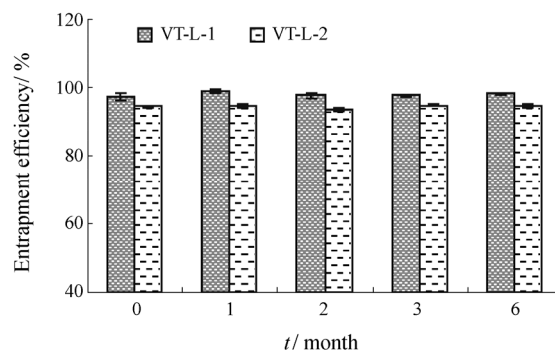


Figure 2 Entrapment efficiency of vinflunine tartrate-loaded liposomes (VT-L) during 6 months ($n = 3$). VT-L-1: VT-L with drug-to-lipid ratio of 1:10; VT-L-2: VT-L with drug-to-lipid ratio of 1:5

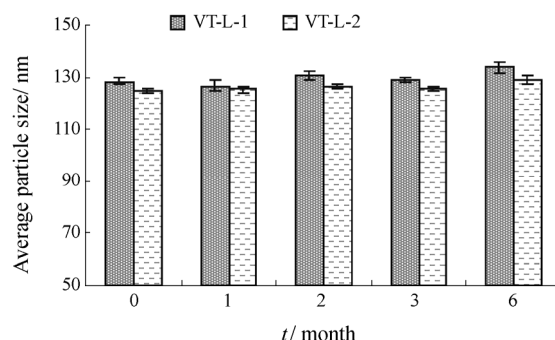


Figure 3 Average particle size of VT-L during 6 months ($n = 3$)

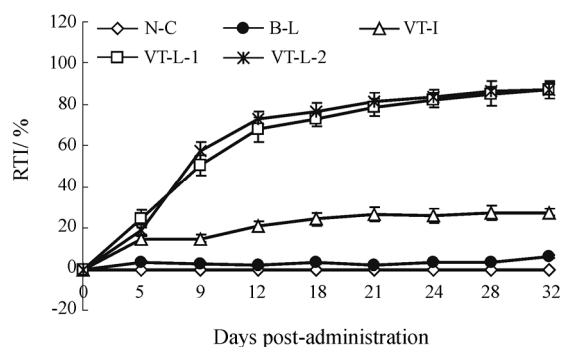


Figure 4 Inhibition effect of VT-L to nude mouse transplanted human non-small cell lung carcinoma A549. N-C: Negative control; B-L: Blank liposome; VT-I: Vinflunine tartrate injection. VT-L-1: VT-L with drug-to-lipid ratio of 1:10; VT-L-2: VT-L with drug-to-lipid ratio of 1:5

Table 1 Therapeutic effect of VT-L to nude mouse transplanted human non-small cell lung carcinoma A549. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. d0: administration at first time; d12: Administration completed; d18: Six days after the last administration; d32: Convalescent period finished. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs N-C; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs VT-I. RTV: Relative tumor volume; RTI: Relative tumor inhibition; TW: Tumor weight

Group	RTV			RTI/%			TW/g
	d12	d18	d32	d12	d18	d32	
N-C	2.55 $\pm$ 0.19	2.79 $\pm$ 0.15	4.15 $\pm$ 0.53	—	—	—	1.68 $\pm$ 0.12
B-L	2.51 $\pm$ 0.21	2.71 $\pm$ 0.25	3.91 $\pm$ 0.29	1.50 $\pm$ 0.19	3.05 $\pm$ 0.40	5.91 $\pm$ 0.77	1.60 $\pm$ 0.15
VT-I	2.03 $\pm$ 0.23*	2.11 $\pm$ 0.30**	3.58 $\pm$ 0.44	20.51 $\pm$ 2.67	24.30 $\pm$ 3.16	13.70 $\pm$ 1.78	1.51 $\pm$ 0.08
VT-L-1	0.82 $\pm$ 0.05 $\triangle\triangle\triangle$	0.75 $\pm$ 0.04 $\triangle\triangle\triangle$	0.55 $\pm$ 0.04 $\triangle\triangle\triangle$	67.81 $\pm$ 5.98 $\triangle\triangle$	73.12 $\pm$ 3.51 $\triangle\triangle$	86.75 $\pm$ 3.98 $\triangle\triangle$	0.31 $\pm$ 0.05 $\triangle\triangle\triangle$
VT-L-2	0.70 $\pm$ 0.08 $\triangle\triangle\triangle$	0.65 $\pm$ 0.08 $\triangle\triangle\triangle$	0.53 $\pm$ 0.07 $\triangle\triangle\triangle$	72.52 $\pm$ 4.12 $\triangle\triangle$	76.70 $\pm$ 3.85 $\triangle\triangle$	87.23 $\pm$ 4.23 $\triangle\triangle$	0.28 $\pm$ 0.04 $\triangle\triangle\triangle$

上述结果表明, B-L 对人非小细胞肺癌 A549 裸鼠移植瘤无抑制作用, 效果等同于 N-C 组, VT-L 对人非小细胞肺癌 A549 裸鼠移植瘤的疗效显著优于 VT-I, 而两种不同药脂比的 VT-L 对非小细胞肺癌 A549 裸鼠移植瘤的疗效无显著差异。

3.2 VT-L 对人非小细胞肺癌 A549 裸鼠移植瘤的毒性 VT-I 组裸鼠给药后均出现卧伏和运动迟缓等现象, VT-L 组裸鼠未出现任何异常反应。观察期间各组均无动物死亡。在对裸鼠的体重影响方面, N-C 组与 B-L 组小鼠生长状态良好, 且二者体重变化曲线基本一致 (图 5), 这表明 B-L 对裸小鼠生长无影响, 无毒副作用。VT-I 组裸鼠体重明显下降, VT-L 组给药期间裸鼠体重略有降低, 但其 RW 明显高于注射液组 ($P < 0.05$), 且于给药结束后体重缓慢增长。观察期结束时, VT-L-1 和 VT-L-2 组裸鼠体重均较初始体重有所增长, 增长率分别为 5.6% 和 4.8%, 二者无显著差异, 而 VT-I 组裸鼠体重较初始体重下降了 13.2%, 较 VT-L 组有显著差异 ($P < 0.01$)。此结果显示, 与 VT-I 相比, VT-L-1 与 VT-L-2 对裸鼠的毒性明显降低 ($P < 0.05$), 且二者毒性无显著差异 ($P > 0.05$)。

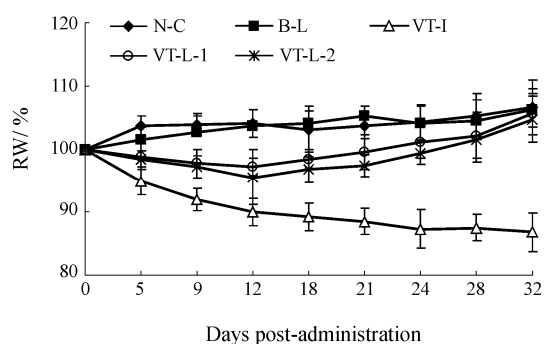


Figure 5 Toxicity of VT-L to nude mouse transplanted human non-small cell lung carcinoma A549. N-C: Negative control; B-L: Blank liposome; VT-I: Vinflunine tartrate injection. VT-L-1: VT-L with drug-to-lipid ratio of 1:10; VT-L-2: VT-L with drug-to-lipid ratio of 1:5

讨论

阳离子交换树脂离心法测定 VT-L 包封率的原理是基于离子交换作用, VT 属于有机弱碱强酸盐类药物, 可以与阳离子交换树脂磺酸基团上的 Na^+ 交换而被吸附, 而脂质体无法被树脂吸附, 从而实现脂质体与游离药物的分离, 该方法回收率较高, 且重现性良好。

pH 梯度法, 即通过内外水相的不同的 H^+ 梯度载药, 可显著提高两亲性药物 (特别是弱酸、弱碱类药物) 的包封率。自从 1976 年被 Deamer 应用于儿茶酚胺脂质体的制备后^[8], pH 梯度法及其机制成为近年来国内外脂质体研究的热点^[9-11], 本实验采用 pH 梯度法制备了两种不同药脂比的 VT-L, 课题前期对 pH 梯度法制备 VT-L 以包封率为考察指标进行了单因素考察, 分别考察了不同外水相 pH 值 (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、不同载药温度 (30 °C、40 °C、50 °C、60 °C) 和载药时间 (10、20、40、60 min) 等因素对包封率的影响。根据单因素考察结果进行了正交设计, 得到载药的最优条件为: 外水相 pH 7.0, 载药温度为 40 °C, 载药时间为 20 min。该处方工艺稳定, 包封率较高。另外, 作者还曾采用硫酸铵梯度法^[10]、EDTA 离子梯度法^[11]和对羟基苯磺酸钠梯度法^[12]等各种主动载药法制备 VT-L, 而这几种方法包封率均不理想 (<80%)。

本实验制备 VT-L 的最后一步操作是采用切向流超滤器置换脂质体的外水相, 不仅可以除去未包封进入脂质体的游离药物, 还可以除去外水相中多余的柠檬酸盐, 从而降低了脂质体本身的毒性和刺激性。另外切向流超滤器在置换脂质体的外水相的同时还可以浓缩脂质体, 简化了制备工艺, 并将脂质体的损失降到最低, 有利于工业化生产, 这是传统的葡聚糖凝胶柱法所无法比拟的。

本实验所制备的两种不同药脂比的 VT-L 与 VT-I

相比, 疗效显著提高, 毒性明显降低; 而两种不同药脂比的 VT-L 的理化性质和药理毒理学性质相似。本课题组目前正在进行 VT-L 在大型动物 (Beagle 犬) 体内的药效学及药物动力学评价, 以期对 VT-L 的体内行为进行更为深入的探索。

References

- [1] Hill BT. Vinflunine, a second generation novel vinca alkaloid with a distinctive pharmacological profile, now in clinical development and prospects for future mitotic blockers [J]. *Curr Pharm Des*, 2001, 7: 1199–1212.
- [2] Kruczynski A, Hill BT. Vinflunine, the latest vinca alkaloid in clinical development. A review of its preclinical anticancer properties [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001, 40: 159–173.
- [3] Hill BT, Fiebig HH, Waud WR, et al. Superior *in vivo* experimental antitumour activity of vinflunine, relative to vinorelbine, in a panel of human tumour xenografts [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35: 512–520.
- [4] Campone M, Cortes-Funes H, Vorobiof D, et al. Vinflunine: a new active drug for second-line treatment of advanced breast cancer. Results of a phase II and pharmacokinetic study in patients progressing after first-line anthracycline/taxane-based chemotherapy [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95: 1161–1166.
- [5] Wang CX, Li CL, Zhao X, et al. Pharmacodynamics, pharmacokinetics and tissue distribution of liposomal mitoxantrone hydrochloride [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1565–1569.
- [6] Jiao YH, Sun KX, Mu HJ, et al. Preparation of sustained release multivesicular liposome for thymopentin and preliminary study on its pharmacokinetics in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 756–760.
- [7] Zhang L, Huang WW, Wang J, et al. Comparison of two methods for determination of entrapment efficiency of vinorelbine bitartrate liposome [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2010, 27: 105–109.
- [8] Nichols JW, Deamer DW. Catecholamine uptake and concentration by liposomes maintaining pH gradients [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455: 269–271.
- [9] Dos Santos N, Cox KA, McKenzie CA, et al. pH gradient loading of anthracyclines into cholesterol-free liposomes: enhancing drug loading rates through use of ethanol [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1661: 47–60.
- [10] Wang SN, Deng YH, Yan Z, et al. Influencing factors in preparation of ciprofloxacin liposomes by ammonium sulfate transmembrane gradients [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2003, 20: 93–96.
- [11] Gubernator J, Chwastek G, Korycińska M, et al. The encapsulation of idarubicin within liposomes using the novel EDTA ion gradient method ensures improved drug retention *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2010, 146: 68–75.
- [12] Zhigaltsev IV, Maurer N, Edwards K, et al. Formation of drug-arylsulfonate complexes inside liposomes: a novel approach to improve drug retention [J]. *J Control Release*, 2006, 110: 378–386.