

坦西莫司脂质体冻干剂的制备及大鼠药代动力学

李楠, 莫然, 张灿*

(中国药科大学新药研究中心, 南京 210009)

摘要 制备坦西莫司脂质体冻干剂, 优化其处方及工艺, 并进行大鼠药代动力学研究。用薄膜分散法制备坦西莫司脂质体, 采用冷冻干燥法制备脂质体冻干剂, 单因素实验考察最佳处方为: 磷脂浓度 24 mg/mL, 药物与磷脂质量比 1:40, 磷脂与胆固醇质量比 10:1, 冻干保护剂蔗糖与磷脂的质量比 2:1。复溶后粒径 (100.8 ± 6.74) nm, 包封率 (95.24 ± 3.58) %。透析法研究脂质体的体外释放行为, 37 °C 下, 在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中 24 h 释放不到 30%。用高效液相色谱法研究最佳处方脂质体的大鼠药代动力学, 其最高血药浓度为市售制剂 Torisel® 的 3.06 倍, 生物利用度为 Torisel® 的 2.49 倍。实验结果显示, 经过处方工艺优化后的坦西莫司脂质体冻干剂包封率较高, 具有缓释效果, 可以显著提高坦西莫司在大鼠体内的生物利用度。

关键词 坦西莫司; 脂质体; 薄膜分散法; 冻干; 药代动力学

中图分类号 R944; R969.1 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)03-0234-05

Preparation of lyophilized temsirolimus-loaded liposomes and their pharmacokinetics in rats

LI Nan, MO Ran, ZHANG Can*

Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Lyophilized temsirolimus-loaded liposomes were prepared; the formulations were optimized; and the pharmacokinetics in rats was investigated. The lyophilized temsirolimus-loaded liposomes were prepared by film dispersion, followed by freeze drying. Formulations were optimized by single-factor design. The optimized formulation contained 24 mg/mL phosphatidyl choline (PC), a weight ratio of 1:40 between drug loading and PC, and a weight ratio of 10:1 between PC and cholesterol. Sucrose was determined as an optimal lyoprotectant, and the weight ratio between sucrose and PC was 2:1. The optimized liposomes had a particle size of (100.8 ± 6.74) nm and an entrapment efficiency of (95.24 ± 3.58) %. Dialytic method was used to investigate the drug release profile. Less than 30% of entrapped drug was released after 24 h at pH 7.4 under 37 °C. In addition, pharmacokinetics of temsirolimus in rats receiving commercial product Torisel® and temsirolimus-loaded liposomes was evaluated after HPLC determination of temsirolimus in rat plasma. c_{\max} and AUC of the liposomes were 2.06- and 1.49-fold improved relative to that of Torisel®, respectively. In conclusion, the optimized lyophilized temsirolimus-loaded liposomes with high entrapment efficiency achieved sustained release and significantly increased bioavailability of temsirolimus in rats.

Key words temsirolimus; liposome; film dispersion method; freeze-drying; pharmacokinetics

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072589)

坦西莫司 (temsirolimus) 为雷帕霉素 (rapamycin) 的丙酸酯衍生物, 2007 年 5 月被美国 FDA 批准用于临床治疗晚期肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC)。该药是第 1 个获准用于治疗 RCC 的一线药物, 也是首个用于 RCC 的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抑制剂。

ma, RCC)。该药是第 1 个获准用于治疗 RCC 的一线药物, 也是首个用于 RCC 的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抑制剂。

* 收稿日期 2013-01-29 *通信作者 Tel: 025-83271171 E-mail: zhangcan@cpu.edu.cn
基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81072589)

制剂^[1-2]。坦西莫司通过抑制细胞质中 PI3K/AKT 信号通路下游 mTOR 的活性,来抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡^[3]。坦西莫司难溶于水,见光易分解。目前上市的制剂为注射剂(商品名 Torisel®),采用 PEG400、Tween 80 和乙醇来增溶。Torisel®对 RCC 患者的治疗效果显著,但存在口腔黏膜炎、皮疹、贫血以及非特异性肺炎等不良反应^[4]。本课题以脂质体作为药物载体,制备了坦西莫司脂质体冻干剂,旨在提高药物的稳定性和生物利用度,减少不良反应的发生。

1 材 料

1.1 药品与试剂

注射用大豆磷脂(磷脂酰胆碱含量>80%,上海太伟药业有限公司);胆固醇(分析纯,上海惠兴生化试剂有限公司);坦西莫司(纯度99%,台州市晟欣医药化工有限公司);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

BS110S型电子天平(德国赛多利斯公司);LC-2010A型液相一体机(日本岛津公司);ZetaPlus电位粒径分析仪(美国布鲁克海文公司)。

1.3 动 物

SD大鼠,雄性,体重(200 ± 20)g,由扬州大学比较医学中心提供,合格证号SCXK(苏)2007-0001。

2 方法和结果

2.1 坦西莫司脂质体的制备

采用薄膜分散法^[5]制备坦西莫司脂质体。取磷脂90mg、胆固醇9mg、坦西莫司3mg溶于氯仿-甲醇(4:1)混合溶剂中,混匀后,40℃水浴抽真空旋干成膜,并在真空干燥器中放置过夜以完全除去有机溶剂后,用超纯水水化脂膜,得到的脂质混悬液用超声波细胞粉碎机冰浴分散,探头超声(65W,10min),分别过0.45μm和0.22μm滤膜即得坦西莫司脂质体混悬液。将脂质体混悬液用超纯水稀释一定倍数后,测定粒径和多分散系数。

2.2 脂质体中坦西莫司的含量和包封率的测定

2.2.1 坦西莫司紫外检测波长选择 取20μg/mL坦西莫司甲醇溶液采用紫外分光光度计于200~400nm波长范围内扫描紫外全波长图谱,在

276 nm处坦西莫司有最大吸收,且此波长处空白脂质体组分对其测定无干扰,故选定276 nm为坦西莫司的检测波长。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: Inertsil® ODS-SP柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-水(80:20);检测波长: 276 nm;柱温: 50 ℃;流速: 1.0 mL/min;进样量: 20 μL。

2.2.3 标准曲线的制备 精密移取100 μg/mL坦西莫司甲醇溶液适量,用甲醇稀释成质量浓度为1,2,5,10,20,30,50 μg/mL的一系列标准溶液,进样20 μL,以峰面积(A)为纵坐标,对照品质量浓度c(μg/mL)为横坐标,作一元线性回归,得到回归方程: $A = 5.509 \times 10^4 c + 6.650 \times 10^3$ ($r = 1$),在1~50 μg/mL范围内线性良好。

2.2.4 包封率的测定 取超声后的载药脂质体25 μL用甲醇定容至5 mL,分别测定0.22 μm滤膜过滤前后载药脂质体混悬液中坦西莫司的含量,过膜前后药物含量之比即为包封率。

2.3 脂质体处方工艺单因素考察

2.3.1 水化时间 制备坦西莫司脂质体,固定水化温度30℃,分别水化0.5,1,2 h。结果显示,随着水化时间的延长,脂质体的粒径基本都在100 nm左右,而包封率从0.5 h的92.0%下降至2 h的78.4%。因此,确定水化时间为0.5 h。

2.3.2 水化温度 制备坦西莫司脂质体,水化温度分别为30℃,37℃,45℃,55℃和60℃。结果显示,随着水化温度的升高,脂质体的粒径逐渐变小,从30℃时的100.91 nm降低为60℃时的75.6 nm。当水化温度大于37℃时,坦西莫司脂质体的包封率下降,从37℃时的93.12%降低为60℃时的72.46%。因此,确定水化温度为37℃。

2.3.3 超声强度与超声时间 制备坦西莫司脂质体,探头超声强度与时间分别为(65 W, 5 min)、(65 W, 10 min)、(65 W, 20 min)、(65 W, 30 min)、(97.5 W, 10 min)、(97.5 W, 20 min)和(97.5 W, 30 min)。结果显示,超声强度越大、时间越长,粒径越小,当超声时间大于20 min,粒径不再减小。此外,超声强度越强,包封率越低;随着超声时间的延长,包封率先增加后降低。因此,确定超声强度为65 W,超声时间为10 min。

2.3.4 药物与磷脂的质量比(药脂比) 制备坦西莫司脂质体,固定胆固醇与磷脂质量比为1:10、

药物3 mg,药脂比分别为1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60。结果显示,随着药物比例的减小,坦西莫司脂质体的粒径逐渐增加,包封率从72.1%增加95.4%,当药脂比小于1:40时,包封率不再增加。因此,确定药脂比为1:40。

2.3.5 胆固醇与磷脂的质量比 制备坦西莫司脂质体,固定药物与磷脂的质量比1:40、磷脂120 mg,胆固醇与磷脂的质量比分别为0:1、1:2、1:3、1:5、1:10、1:15、1:20,测得脂质体粒径和包封率如图1所示。

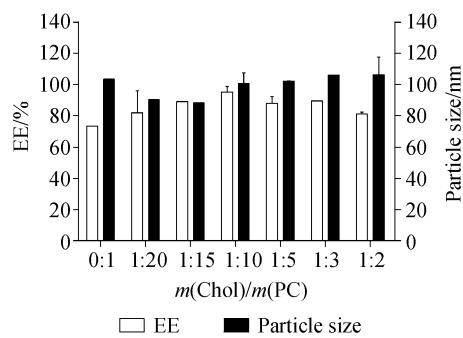


Figure 1 Influence of the weight ratio of cholesterol (Chol) to PC on entrapment efficiency (EE) and particle size of temsirolimus-loaded liposomes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

随着胆固醇用量的增加,粒径先减小后增加,当增加到一定大小时不再增加,胆固醇与磷脂的质量比为1:10时粒径在100 nm左右。坦西莫司脂质体的包封率先增加后减少,胆固醇与磷脂的质量比为1:10时,包封率最大。因此,确定胆固醇与磷脂的质量比为1:10。

2.4 冻干工艺考察

考察冻干保护剂氯化钠、葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇、右旋糖酐对坦西莫司脂质体冷冻干燥过程中的保护作用。将各种冻干保护剂按与磷脂质量比0.5:1、1:1、2:1、4:1,溶于制得的载药脂质体中,完全溶解后,-20℃下预冻24 h,采用冷冻干燥机冻干,得载药脂质体的冻干剂。复溶后,测定粒径,并计算包封率,结果如图2所示。

由图2-A和2-B可见,各种冻干保护剂对坦西莫司冻干保护作用优劣顺序是蔗糖、海藻糖、葡萄糖、右旋糖酐、乳糖、甘露醇、氯化钠。除海藻糖与磷脂质量比在4:1时较大之外,其余粒径变化都在5%以内。由图2-C和2-D可见,蔗糖和海藻糖作为冻干保护剂,坦西莫司脂质体冻干复溶后的包封率均在90%以上,其中蔗糖与磷脂质量比为2:1

时,坦西莫司脂质体的包封率最高,大约为96%。因此,选定冻干保护剂为蔗糖,与磷脂的质量比为2:1。

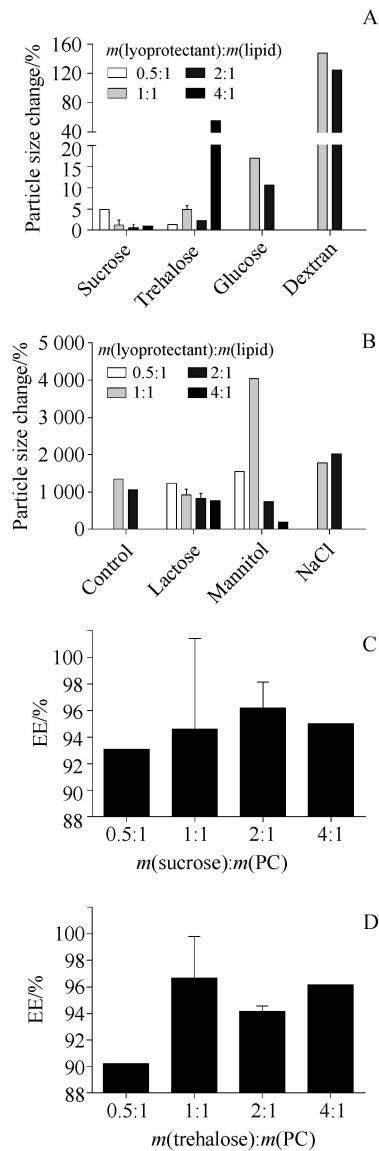


Figure 2 Influence of (A) sucrose, trehalose, glucose, dextran and (B) lactose, mannitol, NaCl with different weight ratios to PC on particle size of temsirolimus-loaded liposomes for lyophilization taking temsirolimus-loaded liposomes freeze-dried without lyoprotectants as a negative control, and influence of (C) sucrose and (D) trehalose on EE of temsirolimus-loaded liposomes for lyophilization ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 体外释放

分别取市售制剂Torisel®和坦西莫司脂质体1 mL置于透析袋内,两端扎紧,分别加入到释放介质50 mL中,释放介质为含1% Tween 80的PBS(pH 7.4),在37℃,50 r/min搅拌下考察其释放情况。分别于1,2,4,6,8,12,24 h取释放介

质 1 mL, 同时补充等体积新鲜的释放介质, 样品过 0.22 μm 滤膜后, HPLC 进样, 记录峰面积, 计算各时间点坦西莫司的释放量, 绘制释放曲线如图 3 所示。

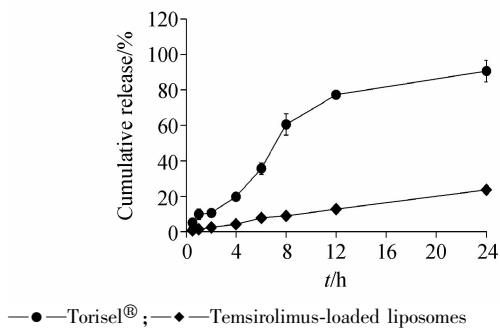


Figure 3 *In vitro* release of Torisel® and temsirolimus-loaded liposomes at pH 7.4 at 37 °C ($\bar{x} \pm s, n=6$)

结果可见, 24 h 内市售制剂 Torisel® 已经基本释放完全, 而坦西莫司脂质体释放不到 30%, 且释放速度小于 Torisel®, 具有缓释效果。

2.6 大鼠体内药代动力学

2.6.1 体内分析方法的建立 色谱条件基本同“2.2.1”项, 流动相改为甲醇-水(76: 24)。配制质量浓度为 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 μg/mL 坦西莫司甲醇标准液, 精密移取 50 μL, 加入到大鼠空白血浆 450 μL 中, 配制成质量浓度为 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 μg/mL 的坦西莫司血浆标准液。

以血浆中坦西莫司的峰面积(*A*)为纵坐标, 坦西莫司血浆标准液的质量浓度(*c*)为横坐标, 作一元线性回归, 得到回归方程为 $A = 1.350 \times 10^4 c + 87.55$ ($r = 0.9999$), 坦西莫司质量浓度在 0.1 ~ 20 μg/mL 范围内线性良好。在考察浓度范围内, 高、中、低浓度血样的绝对回收率均大于 90%, 相对回收率在 95% ~ 105% 之间, 日内、日间精密度均小于 10%, 符合体内分析的要求。

2.6.2 血浆样品采集与处理 SD 大鼠 12 只, 随机均分为两组, 给药前禁食不禁水过夜, 分别尾静脉注射市售制剂和坦西莫司脂质体, 给药剂量为 10 mg/kg, 分别于 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h 眼眶后静脉丛取血 0.4 mL, 置肝素化聚丙烯微量离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 取血浆 100 μL 至聚丙烯微量离心管中, 加入乙腈 200 μL, 涡旋 5 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, HPLC 进样。记录峰面积, 并代入标准曲线计算各时间点的大鼠血浆所含坦西莫司浓度。

大鼠尾静脉注射 Torisel®、坦西莫司脂质体的血药浓度-时间曲线如图 4 所示。

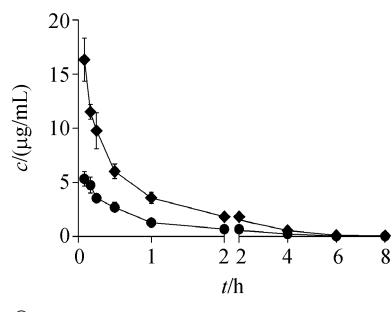


Figure 4 Plasma concentration versus time curves of temsirolimus after intravenous administration of Torisel® and temsirolimus-loaded liposomes at a dose of 10 mg/kg ($\bar{x} \pm s, n=6$)

坦西莫司的市售制剂 Torisel® 和坦西莫司脂质体静注后 5 min, Torisel® 的最高血药浓度(c_{\max})明显低于坦西莫司脂质体, 并且 Torisel® 的血药浓度-时间曲线与坦西莫司脂质体相比, 有显著差别。

将血药浓度-时间曲线采用 Kinetica 4.4 软件进行处理, 按非房室拟合后的药代动力学参数如表 1 所示。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of temsirolimus after intravenous administration of Torisel® and temsirolimus-loaded liposomes at a dose of 10 mg/kg ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Parameter	Torisel®	Temsirolimus-loaded liposomes
c_{\max} /(μg/mL)	5.33 ± 0.67	16.33 ± 1.97 **
$AUC_{0-\infty}$ /(μg·h/mL)	5.04 ± 1.10	13.44 ± 1.57 **
$t_{1/2}/h$	1.03 ± 0.12	1.20 ± 0.13
MRT/h	1.28 ± 0.13	1.35 ± 0.11

** $P < 0.01$ vs Torisel® group

由表 1 可见, 坦西莫司脂质体的 c_{\max} 是坦西莫司市售制剂 Torisel® 的 3.06 倍, $AUC_{0-\infty}$ 是 Torisel® 的 2.49 倍, c_{\max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 有极显著的提升($P < 0.01$)。两种坦西莫司制剂之间的 $t_{1/2}$ 和 MRT 没有显著差异。

3 讨 论

在单因素实验中, 以脂质体的粒径和包封率为考察指标。脂质体的粒径受水化温度和超声强度与时间的影响较大: 水化温度的升高, 超声强度的增加和超声时间的延长都会使粒径变小。本实验中粒径可小至 70 nm 左右。最终选择粒径分布在 100 nm 左右, 一是 100 nm 左右的纳米粒不易被网

状内皮系统所吞噬,具有相对较长的体内半衰期,更易于透过肿瘤部位的新生毛细血管壁达到肿瘤组织^[6-7]。二是考虑到粒径对包封率的影响:一方面,脂质体粒径过大时,虽然载药量较多,但在包封率检测时会被滤膜截留,导致包封率下降;另一方面,脂质体粒径过小时,由于小粒径的脂质体是通过提高超声强度或者延长超声时间得到的,在这个工艺过程中往往易造成药物的泄露,导致包封率的下降。

脂质体的包封率受水化时间、药脂比以及磷胆比的影响较大。本研究主要从药物、磷脂与胆固醇3个方面讨论。首先,坦西莫司本身的化学性质决定了制剂在处方工艺中需要注意避免药物氧化、水解和光解^[8]。所以,操作过程要注意避光,水化时间要尽量短,超声在冰浴下进行、强度较低、时间较短,从而有效避免坦西莫司大量降解,保证药物在脂质体中的稳定性和较高包封率。其次,磷脂的稳定性与用量是保证高包封率的前提。实验中选择较低的水化温度以及较短的水化时间就是为了保护磷脂不被氧化。虽然包封率随磷脂浓度增加而增加,但磷脂等辅料在保证良好的包封率的前提下,用量不宜过大。最后,胆固醇的用量要适宜。胆固醇对载药脂质体起稳定和防止泄露的作用,但是胆固醇过多时,由于胆固醇插入脂质体的脂质双分子层中,会竞争性地占据疏水性药物的空间,导致包封率下降,所以在保证脂质体稳定的情况下,尽量减小胆固醇的用量。

制备冻干剂中,冻干保护剂的加入,可大大减轻甚至消除冻干对脂质体的破坏。其中,二糖是研究最多也是最有效的冻干保护剂,常用的有海藻糖、麦芽糖、蔗糖及乳糖。本实验中,虽然蔗糖与海藻糖都可以使坦西莫司脂质体复溶后具有较高的包封率,但是由于冻干保护剂与磷脂质量比一定时,蔗糖对脂质体复溶后粒径的影响更小,所以最终选择蔗糖为冻干保护剂。寡糖作为冻干保护剂,用量有一最佳值,用量继续增加会导致冻干后包封率下降^[9],这一结论可以解释当蔗糖与磷脂的比例提高到4:1,脂质体复溶后包封率没有继续增加的原因。

体外释放实验结果显示坦西莫司脂质体具有

一定的缓释作用,说明脂质体使药物在到达治疗靶点之前可以大量而稳定地包载于脂质双分子层中,进而保证了药物传递系统在体内转运过程中的稳定性与完整性。

大鼠药代动力学实验中, c_{\max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 极显著的提升($P < 0.01$),表明坦西莫司脂质体可以提高药物在血液中的稳定性,提高药物在大鼠体内的生物利用度。而两种坦西莫司制剂之间的 $t_{1/2}$ 和 MRT 之间没有显著差异,表明两种坦西莫司制剂在大鼠体内的循环时间没有显著差异。可能原因是 Torisel® 进入体内后迅速被消除或被降解,稳定性较差,其 5 min 时血药浓度很小,之后的消除趋势与坦西莫司脂质体相似,导致其血药浓度-时间曲线出现分布较平缓的“假象”。

参 考 文 献

- [1] Strimpakos AS, Karapanagiotou EM, Syrigos KN, et al. The role of mTOR in the management of solid tumors: an overview [J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, **35**(2): 148–159.
- [2] Alvaro PM, Andres RS, Enrique EA, et al. mTOR pathway inhibition in renal cell carcinoma [J]. *Urol Oncol: Semin Orig Invest*, 2012, **30**(4): 356–361.
- [3] Dancey JE, Curiel R, Purvis J. Evaluating temsirolimus activity in multiple tumors: a review of clinical trials [J]. *Semi Oncol*, 2009, **36**(6): S46–S58.
- [4] Wang RJ, Li J. Advances in temsirolimus for treatment of patients with advanced renal cell carcinoma [J]. *Pharm Clin Res(药学与临床研究)*, 2011, **19**(5): 434–438.
- [5] Liu XQ, Wang JY, Tong Y, et al. Advances in preparation methods of liposomes [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2011, **46**(14): 1 084–1 088.
- [6] Asai T. Nanoparticle-mediated delivery of anticancer agents to tumor angiogenic vessels [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, **35**(11): 1 855–1 861.
- [7] Mattheolabakis G, Rigas B, Constantinides PP. Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives [J]. *Nanomedicine*, 2012, **7**(10): 1 577–1 590.
- [8] Jia W. Temsirolimus [J]. *Chinese J Med Chem(中国药物化学杂志)*, 2007, **17**(6): 407.
- [9] Li S, Hou DZ, Sun MJ, et al. Preparation of freeze-dried chitosan-liposome containing L-dopa and pharmacokinetics in rats after oral administration [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2009, **40**(5): 406–411.