

SN-38 脂质体制备、质量评价及初步药效学研究

孙 丽¹, 孙考祥^{1*}, 陈伶俐²

(1. 烟台大学药学院, 山东烟台 264000; 2. 中国科学院上海药物研究所药物制剂研究中心, 上海 201203)

摘要: 采用薄膜水化-高压均质法制备具有长循环性质的注射用 7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38) 脂质体。透射电镜观察到所得脂质体呈球形或椭球形, 动态光散射法测得其平均粒径为 (110±5) nm、多分散系数为 0.25±0.05、 ζ 电位为 (-17.6±1) mV。葡聚糖凝胶柱色谱法测得本品的包封率达 (93±3)%。体外释放显示 SN-38 脂质体在 1% 十二烷基硫酸钠的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中 84 h 累积释放率到达 55.6%, 具有一定的缓释效果。药效学试验结果显示, SN-38 脂质体 (5 mg/kg) 对人胰腺癌 AsPC-1 裸鼠皮下移植瘤的抑制效果与伊立替康注射液 (10 mg/kg) 相当。

关键词: 7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38); 伊立替康; 脂质体; 薄膜水化-高压均质法; 体外释放; 药效学

中图分类号: R944.9 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2019)02-0204-06

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.02.011

Preparation, Quality Evaluation and Preliminary Pharmacodynamics of SN-38 Liposomes

SUN Li¹, SUN Kaoxiang^{1*}, CHEN Lingli²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Yantai University, Yantai 264000;

2. Center for Pharmaceutics Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

ABSTRACT: Main challenges of the clinical use of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) are its facile transition between the active lactone form and the inactive carboxylate form under physiological conditions and its low solubility. The purpose of this study was to develop SN-38 long-circulating liposomes for injection with thin film hydration-high pressure homogenization method to solve these problems and to evaluate its antitumor activity. The spherical and elliptic morphology of the prepared liposomes were observed by transmission electron microscopy (TEM). According to the results of dynamic light scattering, the average diameter, polydispersion index (PDI) and ζ potential of the products were (110±5) nm, 0.25±0.05 and (-17.6±1) mV, respectively. The encapsulation efficiency up to 90% was determined by glucan gel column chromatography. *In vitro* release test was carried out with phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) as release medium. The results showed that the cumulative release amount of SN-38 at 84 h from the liposomes was 55.6%, indicating a long circulation property compared to SN-38 solution. Furthermore, the pharmacodynamic property of the SN-38 liposomes was evaluated with nude mice bearing AsPC-1 human pancreatic carcinoma as models, and the inhibition effect of SN-38 liposomes on tumors was investigated by taking irinotecan injection (CPT-11) as the positive control. The results showed that SN-38 liposomes (5 mg/kg) had a similar inhibition effect compared with irinotecan injection (10 mg/kg).

Key Words: 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38); irinotecan; liposome; thin film hydration-high pressure homogenization method; *in vitro* release; pharmacodynamics

收稿日期: 2018-08-03

作者简介: 孙 丽(1994—), 女, 硕士, 从事药剂学及药物新剂型的研发。

Tel: 15684150756

E-mail: 417190302@qq.com

通信联系人: 孙考祥(1964—), 男, 教授, 从事药物新剂型与新剂型、生物药剂学与药代动力学的研究。

Tel: 0535-3808266

E-mail: sunkx@ytu.edu.cn

喜树碱是从喜树皮和果实中提取的抗肿瘤植物药, 对胃肠道肿瘤和头颈癌等有良好的疗效, 但会引发中性粒细胞减少和迟发型腹泻等不良反应^[1-2]。7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38, **1**) 属于喜树碱类药物, 是已上市药物伊立替康 (CPT-11, **2**) 的活性代谢产物^[3], 其抗肿瘤活性是 **2** 的 100~1 000 倍^[4-5], 具有作用强、活性高的特点。**1** 的作用机

制是通过稳定拓扑异构酶 (Topo) I 与 DNA 形成的复合物而促进细胞凋亡, 继而干扰 DNA 的复制^[6-7]。

1 虽然具有较强的抗肿瘤活性, 但极难溶于水和大部分生物相容性溶剂, 与酸不能成盐。此外, **1** 的内酯环是其抗肿瘤活性的关键部位, 但该结构不稳定, 对热、光、碱等敏感, 在 pH 7 或以上时大部分的内酯结构开环变成羧酸盐, 抗肿瘤活性显著降低, 不良反应增加, 极大限制了 **1** 的应用。

脂质体是由磷脂与胆固醇组成的具有双层结构的封闭囊泡, 生物相容性优良, 作为载体有较大的优势, 并具有被动靶向、长效、缓释等优点^[8]。本研究采用薄膜水化 - 高压均质法制备 **1** 长循环脂质体, 拟为开发高效、低毒、长循环的 **1** 新制剂提供帮助。

1 仪器与试剂

Alliance 2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Nano-ZS90 型粒度测定仪 (英国 Malvern 公司); M-110 型微射流高压均质机 (美国 Microfluidics 公司); ZLXS 5003Y 型纯水仪 (美国 Millipore 公司); Tecnai G2 F20 型透射电镜 (美国 FEI 公司)。

1 原料药 (上海朴颐化学科技有限公司, 含量 98.0%, 批号 S589950); **2** 注射液 (自制, 10 mg : 1 ml); 盐酸伊立替康三水合物 (上海创诺制药有限公司, 含量 101.0%, 批号 DA056-2-180601); 5% 葡萄糖溶液 (华裕制药有限公司, 批号 15071302); 氢化大豆磷脂 (HSPC, 批号 525600-2150562-01)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 - 聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀, 批号 560400-2150367-01) (上海东尚生物科技有限公司); 胆固醇 (上海艾韦特医药科技有限公司, 批号 B6125); 葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 (美国 GE 公司); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

BALB/c 裸鼠 [雌性, (20±2) g, 中国科学院上海药物研究所, 许可证编号: SYXK(沪)2013-0049]。

人胰腺癌 AsPC-1 细胞株 (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。

2 方法与结果

2.1 处方及工艺

采用薄膜水化 - 高压均质法制备 **1** 脂质体悬液。称取 **1** 原料药 20 mg、HSPC 600 mg、胆固醇

200 mg 和 DSPE-PEG₂₀₀₀ 120 mg, 置圆底烧瓶中, 加入氯仿 : 甲醇 (8 : 1) 40 ml, 超声溶解, 于 60 °C 减压旋蒸除去有机溶剂成膜。加入 2 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 40 ml, 水化形成脂质体初乳, 再经微射流高压均质机以 137.9 MPa 的压力均质 5 次, 即得澄清透明的 **1** 脂质体悬液。再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 4 °C 密封保存。

2.2 脂质体的形态及粒度分布

2.2.1 脂质体的形态

取“2.1”项下制备的 **1** 脂质体悬液, 以水适当稀释后用 2% 磷钨酸负染, 滴至专用铜网上, 自然挥干, 静置使粒子在铜网上沉积, 用透射电镜观察其形态。结果在透射电镜下观察到 **1** 脂质体的外观呈球形或椭球形 (图 1)。

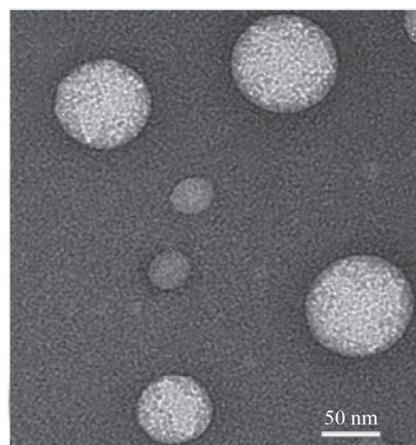


图 1 **1** 脂质体的透射电镜照片 (×3 000)
Fig.1 TEM Image of **1** Liposomes (×3 000)

2.2.2 **1** 脂质体的粒度分布及 ζ 电位测定

取“2.1”项下制备的脂质体悬液, 以超纯水稀释后, 测定粒径及 ζ 电位。结果 (图 2) 显示, 脂质体的平均粒径为 (110±5) nm (n=3), PDI 为 0.25±0.05 (n=3), 表明制备的脂质体粒度分布比较均一; ζ 电位为 (-17.6±1) mV (n=3)。

2.3 **1** 脂质体包封率的测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱 Waters XBridge C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 乙腈 : 水 (30 : 70); 检测波长

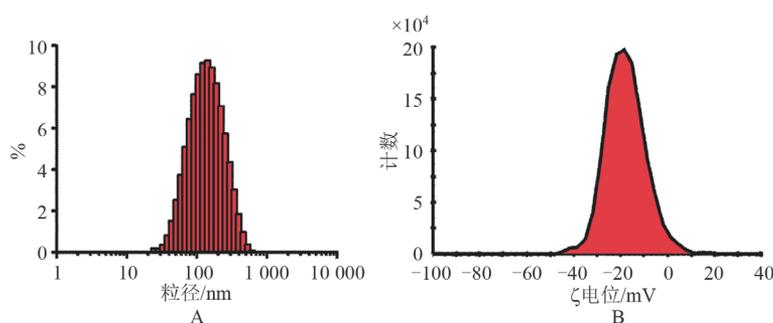


图2 1 脂质体的粒度分布 (A) 及 ζ 电位分布 (B)

Fig.2 Particle Size Distribution (A) and ζ Potential Distribution (B) of 1 Liposomes

265 nm ; 柱温 30 ℃ ; 流速 1.0 ml/min ; 进样量 20 μl。

2.3.2 方法学考察

以甲醇配制 1 的系列浓度溶液，分别进样测定。以峰面积 (*A*) 为纵坐标、1 浓度 (*c*) 为横坐标进行线性回归，得到的标准曲线方程为 $A=65\ 922.17c-1435.12$ ($r=0.999\ 9$)，结果表明 1 浓度在 0.25 ~ 10 μg/ml 范围内线性良好。

取同一供试品溶液，按上述色谱条件重复进样测定 5 次，记录峰面积，计算得 RSD 为 0.60% ($n=5$)，表明精密度良好。取同一供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件在 0、2、4、6、8 和 12 h 进样测定，计算得 RSD 为 1.01% ($n=6$)，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。高、中、低浓度样品的平均加样回收率分别为 (102.45±0.33)%、(100.00±0.28)%、(99.78±1.93)% ($n=3$)。

2.3.3 洗脱曲线的绘制

取充分溶胀（冷水中浸泡 12 h 以上）的葡聚糖凝胶 Sephadex G-50，装填于色谱柱内，制备凝胶柱 (45 cm×1 cm)，共制备 2 根。取 1 溶液（取 1 原料药 5 mg，加入 10 mmol/L 氢氧化钠溶液 10 ml 溶解即得）及“2.1”项下制备的 1 脂质体悬液 0.5 ml 上柱，分别以 10 mmol/L 氢氧化钠溶液及 25 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 洗脱。按每管 2 ml 收集洗脱液；碱洗脱液加入盐酸酸化后进样测定，带有乳光的酸洗脱液用甲醇溶解后进样测定。结果显示 1 脂质体在第 7 ~ 14 管流出，游离药物在第 20 ~ 44 管流出，表明游离药物与脂质体可实现良好的分离（图 3）。

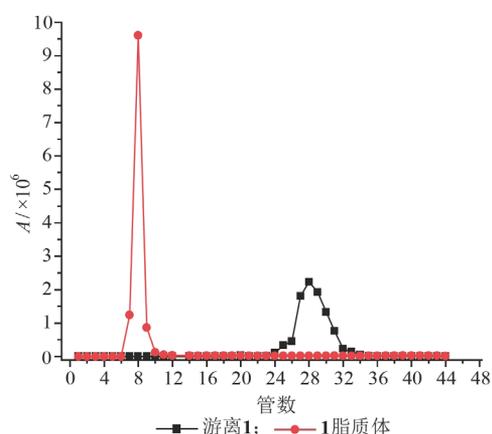


图3 洗脱曲线

Fig.3 Elution Curves of 1 Liposomes

2.3.4 柱回收率与柱加样回收率

配制 3 种不同浓度的 1 溶液，分别取 0.5 ml 上柱，将收集的 1 组分酸化后，按“2.3.1”项下条件进行色谱分析，计算柱回收率。结果平均值为 (96.23±2.33)% ($n=3$)。另将 3 种不同浓度的 1 溶液与空白脂质体混合，得标准混合液，分别取 0.5 ml 上柱，将收集的 1 组分酸化后进样测定，计算得柱加样回收率，结果平均值为 (101.53±2.63)% ($n=3$)。

2.3.5 包封率测定

精密量取“2.1”项下 1 脂质体悬液 0.5 ml 上柱，先以 25 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 洗脱至脂质体组分全部流出，再换用 10 mmol/L 氢氧化钠溶液洗脱未包封的游离药物。按洗脱曲线收集脂质体组分，移至 50 ml 量瓶中，用甲醇定容，摇匀后精密

量取 5 ml 置 10 ml 量瓶, 再用甲醇定容, 用于测定脂质体中包载的药量 W 。另取脂质体悬液 0.5 ml 置 50 ml 量瓶中, 同法操作, 测得脂质体悬液中的总药量 W_0 。按“2.3.1”项下色谱条件分别进样测定, 计算得 1 脂质体的包封率为 $(93 \pm 3)\%$ ($n=3$)。

2.4 脂质体体外释放测定

精密量取“2.1”项下 1 脂质体悬液和 1 溶液 1 ml, 分别置经预处理的透析袋(截留分子量 10 000)中, 将袋口扎紧, 置释放介质[1%十二烷基硫酸钠(SDS)的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)]20 ml 中, 于 $(37 \pm 5)^\circ\text{C}$ 恒温振荡, 转速为 100 r/min。分别于 2、4、6、12、24、30、36、48、60、72、78 和 84 h 取出全部释放介质(及时更换同温等量释放介质)。取不同时间点的释放外液 1.5 ml, 加入 10 mol/L 盐酸 20 μl 酸化后按“2.3.1”项下条件测定, 计算累积释放率(Q)。结果表明, 1 溶液在 36 h 时的释药量可达 90.2%, 而 1 脂质体在 84 h 时的累积释放率为 55.6%, 表明 1 脂质体具有一定的长循环和缓释效果(图 4)。

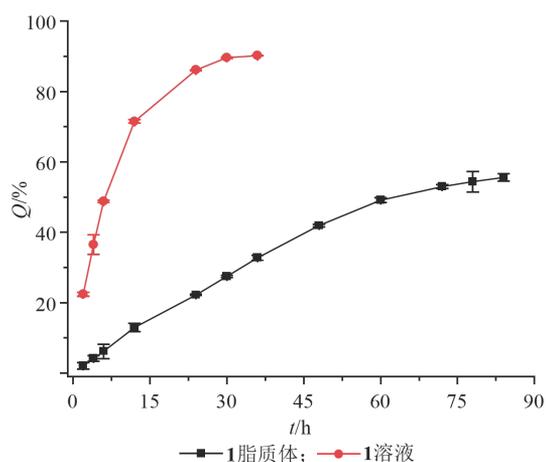


图 4 1 脂质体的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig.4 Release Curves of 1 Liposomes ($n=3$)

2.5 药效学试验

2.5.1 动物模型的建立

将人胰腺癌 AsPC-1 细胞株以每只 5×10^6 个的密度接种至裸鼠右侧腋窝皮下。用游标卡尺测量肿瘤直径, 待肿瘤生长至体积约为 300 mm^3 , 取出肿

瘤组织剪切成约 1.5 mm^3 的瘤块, 在无菌条件下接种于健康裸鼠右侧腋窝皮下, 待肿瘤生长至平均体积为 $140 \sim 150 \text{ mm}^3$, 分组给药。

2.5.2 试验用药

2 注射液: 取盐酸伊立替康三水合物 2.17 g(相当于含 2.2 g)、山梨醇 4.5 g、乳酸 90 mg, 加入适量灭菌注射用水, 超声溶解, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 3.5, 加灭菌注射用水至 200 ml, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜无菌过滤, 按每瓶 10 ml 分装。临用前以 5% 葡萄糖溶液稀释到给药浓度。

1 脂质体注射液: 取“2.1”项下制备的脂质体悬液, 临用前以 5% 葡萄糖溶液稀释至给药浓度。

2.5.3 试验分组与给药

将 18 只荷瘤裸鼠随机分为 3 组, 分别为试验组(1 脂质体, 5 mg/kg)、阳性对照组(2 注射液, 10 mg/kg)、对照组(5% 葡萄糖溶液)。以上 3 组试验动物均每周尾静脉注射给药 3 次(间隔 1 d), 连续给药 3 周, 给药体积均为 0.2 ml。

2.5.4 药效评价指标

试验中观察裸鼠的一般生理情况及移植瘤体积增长情况。每周 2 次称量裸鼠体质量并记录, 同时测量移植瘤长径(a)和短径(b), 按公式计算肿瘤体积 $V(V=0.5 \times a \times b^2)$ 。最后一次给药 24 h 后处死动物, 剥离肿瘤并称重。以相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV)、体积抑瘤率(volum inhibition rate, VIR)、瘤重抑制率(weigh inhibition rate, WIR)为指标进行药效学评价。计算公式如下。

$$\text{RTV} = V_t / V_0$$

$$\text{VIR} = \text{RTV}_{\text{对照}} / \text{RTV}_{\text{给药}} \times 100\%$$

$$\text{WIR} = (W_{\text{对照}} - W_{\text{给药}}) / W_{\text{给药}} \times 100\%$$

式中, V_0 为分组给药时测量所得的肿瘤体积, V_t 为每次测量时的肿瘤体积; W 为瘤重。

2.5.5 结果与讨论

给药时的裸鼠已处于成熟期, 此阶段的健康裸鼠体质量会维持在 20 g 左右。若给予荷瘤裸鼠的药物毒性大, 会使裸鼠的体质量下降; 若裸鼠的体质量无明显下降, 则提示给予的药物无明显毒性。本试验中, 给药组裸鼠的体质量无明显变化, 表明 1

脂质体对裸鼠生长无明显的毒性 (图 5)。

1 脂质体组对人胰腺癌 AsPC-1 裸鼠皮下移植瘤的生长抑制作用与 2 注射液相当 (图 6), 提示 1 脂质体 (5 mg/kg) 与 2 注射液 (10 mg/kg) 效用相当。

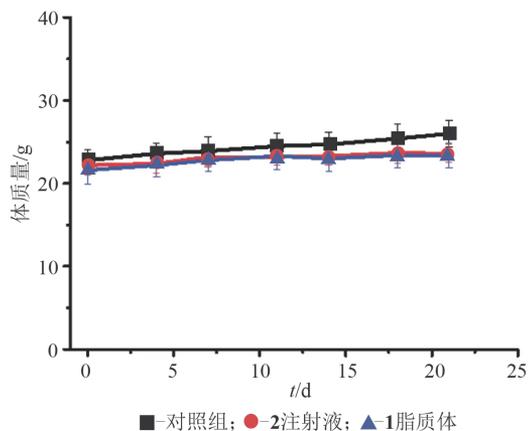


图 5 荷瘤裸鼠的体质量 (n=6)

Fig.5 Body Weight of Tumor-Bearing Nude Mice (n=6)

3 讨论

1 是伊立替康的活性代谢产物, 水溶性和脂溶性均较差, 本试验采用薄膜水化 - 高压均质法制备脂质体, 操作简便快速, 制得的脂质体粒径均一、包封率高, 具备开发前景。DSPE-PEG₂₀₀₀ 的加入可以降低网状内皮细胞对于脂质体的摄取, 延长药物体内循环的时间; 并可使脂质体荷负电, 增加脂质体的物理稳定性。由于目前无 1 的上市制剂, 所以药效学试验中采用 2 注射液为阳性对照。理论上, 1 应分布在脂质体的双分子层中, 可减少其内酯环的开环, 有利于提高药效。因此在设计给药剂量时, 1 脂质体为 5 mg/kg, 而 2 注射液为 10 mg/kg。本试验表明, 试验组和阳性对照组对荷瘤裸鼠的肿瘤抑制效果相似, 提示 1 脂质体的药效较高, 具有一定的临床优势。

1 脂质的体外释放采用动态透析法测定。由于 1 在 PBS 中溶解度较小, 为达漏槽条件, 在 PBS

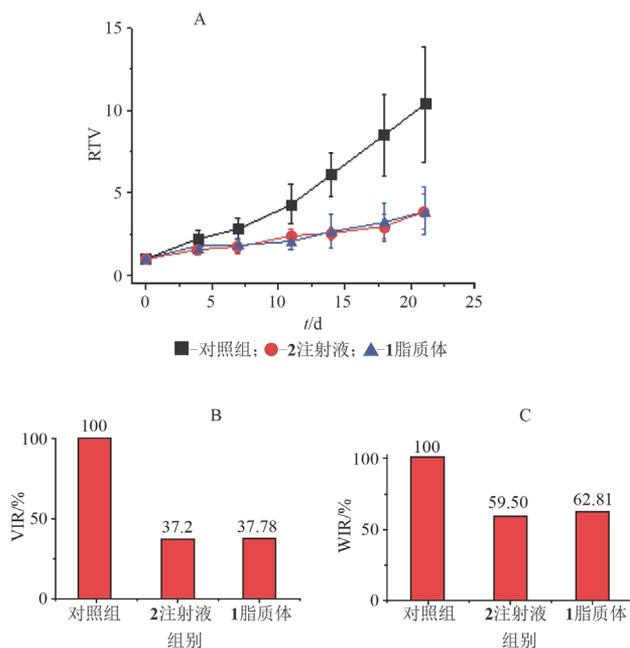


图 6 各试验组的相对肿瘤体积 (A)、体积抑瘤率 (B) 和瘤重抑制率 (C) (n=6)

Fig.6 Relative Tumor Volume (A), Volum Inhibition Rate (B) and Weigh Inhibition Rate (C) of Each Group (n=6)

中加入 1% SDS。1 脂质体在 84 h 累积释放率为 55.6%，可能是因为 HSPC 的相变温度为 53 °C，在 37 °C 的释放条件下该脂质体较稳定，为药物在体内的长循环释放提供了可能。

采用制剂手段将 1 制备成脂质体弥补了其自身的生物药剂学缺陷，避免了体内开环失活。相较于自制的 2 注射液既提高了生物安全性又增强了疗效，因此 1 脂质体剂型具有开发前景。

参考文献:

- [1] BAI R, DENG X, WU Q, *et al.* Liposome-loaded thermo-sensitive hydrogel for stabilization of SN-38 via intratumoral injection: optimization, characterization, and antitumor activity [J]. *Pharm Dev Technol*, 2018, **23**(1): 106-115.
- [2] ENGLAND R M, HARE J I, BARNES J, *et al.* Tumour regression and improved gastrointestinal tolerability from controlled release of SN-38 from novel polyoxazoline-modified dendrimers [J]. *J Controlled Release*, 2017, **247**: 73-85.
- [3] BALA V, RAO S, PRESTIDGE C A. Facilitating gastrointestinal solubilisation and enhanced oral absorption of SN38 using a molecularly complexed silica-lipid hybrid delivery system [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, **105**: 32-39.
- [4] MOSALLAEI N, MAHMOUDI A, GHANDEHARI H, *et al.* Solid lipid nanoparticles containing 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN38): Preparation, characterization, *in vitro*, and *in vivo* evaluations [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, **104**: 42-50.
- [5] POMMIER Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition [J]. *Chem Rev*, 2009, **109**(7): 2894-2902.
- [6] 代鲁平, 宋春霞, 邵先祥, 等. 抗癌药物喜树碱类衍生物的研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2010, **45**(23): 1813-1815.
- [7] JENSEN N F, AGAMA K, ROY A, *et al.* Characterization of DNA topoisomerase I in three SN-38 resistant human colon cancer cell lines reveals a new pair of resistance-associated mutations [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, **35**: 56.
- [8] 徐勇军, 马波, 乔建斌, 等. 脂质体结构的影响因素[J]. *昆明医科大学学报*, 2012, (S1): 209-213.
- [12] SUN T, LI C D, HAN L, *et al.* Functional knockout of FUT8 in Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 to produce a defucosylated antibody [J]. *Eng Life Sci*, 2015, **15**(6): 660-666.
- [13] ZONG H F, HAN L, DING K, *et al.* Producing defucosylated antibodies with enhanced *in vitro* antibody-dependent cellular cytotoxicity via FUT8 knockout CHO-S cells [J]. *Eng Life Sci*, 2017, **17**(7): 801-808.
- [14] KAWABE Y, KOMATSU S, KOMATSU S, *et al.* Targeted knock-in of an scFv-Fc antibody gene into the hprt locus of Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 and CRISPR-Cas9 systems [J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, **12**(5): 599-605.
- [15] DOENCH J G, FUSI N, SULLENDER M, *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(2): 184-191.
- [16] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, **529**(7587): 490-495.

~~~~~

(上接第199页)