

新型药物载体：脂质微球

Washington C *et al*

摘要 脂质微球(LM)在组织分布上与脂质体相似,可以选择性地在肿瘤及炎症部位蓄积,改变了药物的体内生物分布。研究表明,与抗肿瘤药1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脒(BCNU)溶液剂相比,BCNU-LM制剂体外被肿瘤细胞摄取明显增加,体内抗肿瘤活性显著增强,毒性降低。非甾体抗炎药氟比洛芬易引起胃粘膜损伤等副作用,将氟比洛芬乙酸乙酯前药制成LM制剂,临床试验表明,与药物口服剂型相比,LM制剂起效快,可迅速止痛,不良反应发生率低,该制剂已在日本上市。另外,还讨论了影响LM分散系稳定性的各种因素。

关键词 脂质微球;脂质毫微球;稳定性;靶向给药

1 前言

脂质体、用对肿瘤特异性抗原导向的单克隆抗体包衣的微囊等新型药物输送系统可以对肿瘤细胞或组织定位给药,减少抗肿瘤药的毒性,增强抗癌效果。但这些载体系统制备过程复杂,在安全性及稳定性方面还存在一定的问题,临床使用效果也不理想。将药物溶于脂肪油中经乳磷脂乳化分散于水相后制成脂质乳剂,是一种以脂肪油为软基质而被磷脂膜包封的微粒体分散系,其中平均粒径200和50nm的乳粒分别被称为脂质微球(lipid microspheres, LM)及脂质毫微球(lipid nanospheres, LN)。LM与LN在组织分布上与脂质体相似,可选择性地在肿瘤及炎症部位蓄积,是新型药物靶向治疗载体。脂质乳剂制备工艺简单,药物包封率高,安全性及稳定性好,给药方便。

2 抗肿瘤药脂质微球及脂质毫微球

亚硝基脒是一类亲脂性药物,可以穿透血脑屏障,对神经组织原发性脑肿瘤及恶性淋巴瘤显示较强的抗癌活性。但长期使用该类药物可因药物蓄积导致骨髓抑制、肾毒性及肺毒性等毒副作用。1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脒(BCNU)是临床使用的亲脂性最强的亚硝基脒类药物,作者将BCNU制成BCNU-LM及BCNU-LN,对其组织分布及抗肿瘤活性进行了研究。

2.1 LM体外被肿瘤细胞摄取实验

用磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸或卵磷脂为乳化剂制备LM,其平均粒径为200nm。将 ^{14}C 三油酸甘油酯标记的LM与L1210等肿瘤细胞在37℃培育4h后,测定肿瘤细胞的放射性来估算肿瘤细胞摄取LM的数量。同游离 ^{14}C 三油酸甘油酯相比, ^{14}C 三油酸甘油酯标记的LM被L1210细胞的摄取增加3倍以上,LM被其他肿瘤细胞的摄取也高于游离的 ^{14}C 三油酸甘油酯。但这一摄取过程与LM粒径有关,当LM粒径减小至140nm时,其被肿瘤细胞的摄取仅为较大粒径LM的1/10。

2.2 BCNU-LM的稳定性

在4℃放置3个月,BCNU-LM混悬液药物残留率为80%,而BCNU生理盐水溶液药物4周后仅剩余38.9%。在室温下,BCNU-LM放置5d后剩余80%的药物,而BCNU水溶液3d后药物仅剩余3.5%。在37℃放置时,BCNU-LM及BCNU溶液的药物含量均快速下降;在人血清中37℃浸泡5min,BCNU-LM分散系即被破坏,油水相分离,LM可释放90%的药物。

2.3 LM体内分布实验

将 1×10^6 MM46肿瘤细胞在 $\text{C}_3\text{H}/\text{He}$ 小鼠肋皮下接种后,用 ^{14}C 三油酸甘油酯标记的LM经尾静脉给药,定时采集血浆,杀死小鼠后取出肿瘤及其他组织,加入1mL组织增溶剂和异丙醇溶解后,测定组织溶解液的放射性。结

果表明, LM 体内分布与其粒径及脂质组成有关。LM 从血中消除速率与其粒径有关, 粒径较小的 LM 从血中消除较慢。注射后 0.5 h LM 即可到达肿瘤部位。给药后 24 h, 用磷脂酰胆碱制备的平均粒径为 140 nm 的 LM 与平均粒径为 200 nm 的标准 LM, 在肿瘤中蓄积量分别为给药量的 0.969% 与 0.632%, 说明粒径较小的 LM 在肿瘤部位浓度较高。此外, 标准 LM 可显著在肝脏及脾脏中蓄积, 而较小的 LM 被肝脏截留及脾脏摄取较少。另外, 用大豆磷脂酰肌醇制备的 LM 在注射后 2 h 肿瘤部位浓度最高 (1.871%), 而与之相比, 用磷脂酰丝氨酸制备的 LM 注射后 2 h 肿瘤摄取仅为 1/2。

2.4 BCNU-LM 体内抗肿瘤实验

将 CDF₁ 小鼠随机分为 12 组, 每组 10 或 11 只。小鼠用 L1210 腹水细胞 (1×10^5) 腹腔注射接种后第 2 d 开始给药, 每日静脉注射一次, 连续给药 5 d。结果表明, 生理盐水对照组及 LM 对照组的小鼠平均存活时间分别为 7.08 ± 0.27 d 及 7.36 ± 1.20 d, 说明空白 LM 对小鼠存活时间没有影响。与游离 BCNU 组相比, 给予 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ BCNU-LM 组平均存活时间延长, 但统计学检验并不显著; 给药剂量增加到 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, BCNU-LM 组小鼠平均存活时间明显延长 ($P < 0.01$)。

单剂量给药实验在肿瘤接种后第 2 d 进行。以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量给药后, BCNU-LM 组小鼠平均存活时间明显长于游离 BCNU 溶液组 ($P < 0.01$); 与生理盐水对照组相比, BCNU-LM 组及游离 BCNU 溶液组小鼠平均存活时间分别延长了 74.7% 及 49.4%。

间歇给药实验在肿瘤细胞接种后第 2, 9, 16 d 进行。与连续给药实验结果相比, 间歇给药治疗抗癌效果增强。在 10, 20, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 三个剂量水平, 游离 BCNU 溶液组小鼠平均存活时间与生理盐水对照组相比分别延长了 36.5%, 97.2% 及 400.6%, 而 BCNU-LM 相应剂量组小鼠平均存活时间分别比 LM 对照组延长 65.6%, 412% 及 626.9%。在 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量

水平, 游离 BCNU 溶液组 10 只小鼠中有 4 只存活 60 d 以上, 可以认为肿瘤得到治愈; 而用 BCNU-LM 治疗的小鼠 10 只中有 9 只存活 60 d 以上。

实验中发现, BCNU-LM 给药后小鼠体重仅出现短暂减轻, 但很快恢复, 小鼠血中白细胞数及血红蛋白含量与正常小鼠基本一致; 而用游离 BCNU 溶液治疗的小鼠血中白细胞数偏高, 血红蛋白含量下降。

2.5 BCNU-LN 体内抗肿瘤实验

BCNU-LN 平均粒径为 50 nm, 其稳定性与 BCNU-LM 相似。连续给药实验表明, 用 3 或 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量治疗后, BCNU-LN 组小鼠平均存活时间分别比 LN 对照组延长了 28% 或 163%; 在 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量水平, BCNU-LN 组小鼠平均存活时间明显长于游离 BCNU 溶液组, 而 BCNU-LM 组与游离 BCNU 溶液组之间的差别并不明显。在 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 单剂量给药实验中, BCNU-LN 组小鼠平均存活时间也长于 BCNU-LM 组。在间歇给药实验中, BCNU-LN 组小鼠生存时间明显长于游离 BCNU 溶液组。

2.6 BCNU-LM 的毒性

正常雄性 CDF₁ 小鼠间歇静脉给药后, BCNU-LM 与 BCNU 溶液的 LD₅₀ 分别为 71 及 $73.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, BCNU-LM 的毒性略高于 BCNU 溶液。以 10 或 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 间歇给药时 (累积剂量为 30 及 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), BCNU-LM 组小鼠均存活 60 d 以上; 剂量增加到 60 及 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时毒性明显增加, 小鼠平均存活时间分别为 13.1 ± 1.27 d 及 6.6 ± 0.99 d。

3 非甾体抗炎药脂质微球

非甾体抗炎药 (NSAID) 具有抗炎、止痛及解热作用, 临床用于疼痛或炎症疾病的治疗。目前市场上 NSAID 制剂多为口服剂型或栓剂, 由于已经发现口服 NSAID 后易引起胃肠道紊乱等副作用, 而且在治疗术后疼痛或因癌症引起的疼痛时, 多数患者无法口服药物, 因此有必要研制 NSAID 的静脉给药剂型。LM 可以选择

性地蓄积在炎症组织及血管损伤部位,改变了药物的体内分布,因此将NSAID制成LM制剂静脉给药,可能具有靶向治疗的作用,使药物选择性到达炎症部位,随后被前列腺素(PG)合成细胞,如巨噬细胞和中性白细胞摄取,抑制PG的生物合成。

3.1 氟比洛芬脂质微球

氟比洛芬(flurbiprofen)是临床广泛使用的NSAID类药物,由于其难溶于水,很难制成注射剂型。将氟比洛芬脂化得到的前药具有一定的亲脂性,可溶于大豆油中制成LM制剂,用于静脉注射。同氟比洛芬口服剂型相比,LM制剂起效更迅速,不易引起胃粘膜损伤等不良反应。1992年7月,酯化氟比洛芬LM商品注射液在日本上市,每5mL乳剂含50mg氟比洛芬乙酸酯前药,用于治疗术后及因癌症引起的疼痛。

3.2 氟比洛芬药理及药动学

氟比洛芬乙酸酯LM静脉给药后,释放的氟比洛芬乙酸酯被血中酯酶迅速水解成其活性代谢物氟比洛芬,形成较高血药浓度抑制PG的生物合成,可以迅速止痛。

健康受试者静注氟比洛芬乙酸酯LM制剂5mL后5~10min,血药浓度即达峰值,药物消除半衰期为5.8h。48h内尿中药物累积排泄量约为给药剂量的85%。每间隔12h连续给药5次后,48h内尿中药物累积排泄率达到近85%,未发现药物在体内蓄积。

3.3 临床评价

临床实验用双盲法进行。在234例剖腹术后疼痛的患者中有167例(71.4%)症状得到改善或显著改善;在236例因癌症引起的中度至重度持续疼痛的患者中,有165例(69.9%)症状得到改善或显著改善。

76.6%的术后疼痛患者静脉注射氟比洛芬乙酸酯LM制剂后,15min内即可以止痛,50.5%的患者止痛时间大于3h;38.2%与79.4%的因癌症引起疼痛的患者分别在给药后15和30min内可以止痛,52.9%的患者止痛时间在9h以上。

3.4 副作用

在总共1089名患者中,有32名患者(2.9%)出现38项不良反应,其中仅有15项为胃肠道失调,如恶心、呕吐及腹泻。全部患者中有1%出现GOT、GPT及BUN值异常。该制剂无呼吸抑制等中枢神经系统副作用,没有依赖性,不影响处于麻醉状态的患者的苏醒。氟比洛芬乙酸酯LM制剂使用安全、方便,可望广泛用于临床。

4 脂质微球分散系的稳定性

药用脂质乳剂的稳定性是其制剂学研究的重要方面。一般要求脂质乳剂在制备及高压灭菌过程中应保持稳定,其贮存期应至少在1年以上。

4.1 脂质乳剂的物理不稳定过程及稳定性测定方法

脂质乳剂的物理不稳定过程可分为絮凝或凝聚过程。絮凝为一可逆过程,此时乳滴间界面仍保持完整,但粒子互相粘连形成块状物;而在凝聚过程中,乳滴间界面不再存在,大量微小的乳滴融合形成大粒子,是不可逆过程。絮凝速率的测定最早采用比浊法,通过测定脂质乳剂的浊度来计算绝对絮凝速率。但目前常用的方法是将样品稀释,使光能够透过后,用光探测器测定乳剂的光透射动力学变化来测定相对絮凝速率,如流变镜检测法。凝聚速率的测定是通过使用库尔特计数器及各种光折射仪器分析凝聚的粒子粒径变化。

4.2 脂质乳剂稳定性理论

脂质乳剂粒子间可能存在以下几种作用力:(1)范德华力:这是存在于所有粒子间的吸引力,可反映乳剂连续相及分散相间吸引作用的强弱;(2)静电斥力:其大小由粒子表面ζ电势平方根决定,与电性无关;(3)溶媒作用:这是由溶媒与粒子表面相互作用形成的作用范围极短的斥力,一般仅在粒子间隔仅有数纳米的状态下对乳剂稳定性有较大影响;(4)空间位阻:即当长链亲水性大分子吸附或嫁接到粒

子表面时,会产生空间互相排斥作用。以卵磷脂为乳化剂制备的 LM 分散系稳定性主要与粒子间静电作用有关。

4.3 磷脂乳化剂的性质对脂质乳剂稳定性的影响

用于制备注射乳剂的磷脂或卵磷脂多为不同磷脂的混合物,影响其物理性质的因素有:

(1) 酰基链的饱和度对磷脂相转变温度(T_p)及表面行为有一定影响。通常,双饱和脂质的 T_p 高于室温,如二棕榈酰脂磷脂酰胆碱(DPPC)为 42°C ,而引入不饱和键后会引起 T_p 降低,如二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)为 -8°C 。用饱和磷脂制得的乳剂非常稳定,但目前常用的磷脂多为不饱和的,如卵磷脂及豆磷脂等,其分子不饱和度可以用碘数目表示。(2) 酰基链长度也影响 T_p ,酰基链较长的磷脂 T_p 较高。多数天然卵磷脂酰基链长度为 $14\sim 20$ 个碳,通常为 $16\sim 18$ 个碳。(3) 首基性质影响磷脂的离子化行为。首基中最常见的有胆碱及乙醇胺,这类磷脂在 pH 7 呈中性。而以丝氨酸及甘油为首基的磷脂在 pH 7 带负电荷,被称为酸性脂质。天然卵磷脂及豆卵磷脂中仅含约 $1\%\sim 2\%$ 的酸性脂质,但它们可在乳滴表面形成 $-40\sim -60\text{ mV}$ 的 ζ 电势,使乳剂长期保持稳定。

卵磷脂粗品经色谱方法提纯除去杂质后,可制得符合注射规格的商品磷脂。其中 Lipoid E80 (Lipoid AG)或 Ovoidin 180 (Lucas-Meyer)为高度不饱和磷脂,约含 80% 磷脂酰胆碱,另外含少量酸性脂质,在 pH 7 时在乳滴表面可形成较高 ζ 电势和极好的乳剂稳定性。提纯的磷脂进一步色谱纯化后,产品中磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺含量可达 $95\%\sim 100\%$,如 Lipoid E100 或 Ovoidin 200 几乎没有酸性杂质,在 pH 7 时乳

粒表面 ζ 电势很低,不是理想的乳化剂。不饱和和卵磷脂碘数通常为 $60\sim 80$,经催化氢化反应后可制得碘数 $2\sim 5$ 的饱和脂质,如 Lipoid E100-3 及 E80-3。

4.4 药物脂质乳剂的稳定性

可被包入 LM 的脂溶性药物可分为三类:

(a) 弱碱性药物,在处方 pH 条件下带正电性;
(b) 弱酸性药物,在处方 pH 条件下带负电性;
(c) 在处方 pH 条件下药物不带电荷。研究发现,选择适宜的 pH 范围对 a 及 b 类药物脂

质乳剂稳定性非常重要。S-依莫帕米(emopamil)是一疏水性游离碱, $\text{pK}_a = 8.85$, $\text{log}P = 5.32$ 。将药物溶于豆油后,以 1.2% 卵磷脂为乳化剂制备脂质乳剂。当以普通注射用卵磷脂 Ovoidin 180 为乳化剂时,在 pH 7 时药物所带的正电荷足以中和乳滴表面电荷,导致乳剂迅速絮凝;而当处方 pH 调整为 $4\sim 5$ 时,乳粒表面 ζ 电势达到 $30\sim 50\text{ mV}$,乳剂可长期保持稳定。此外,如果选择 Ovoidin 200 为乳化剂时,在 pH 7 时空白乳剂 ζ 电势仅为 $-10\sim -20\text{ mV}$,乳剂快速絮凝;当处方 pH 调整为 $5\sim 6$ 时,乳粒具有较高的表面电势,室温下乳剂稳定期限可达 2 年。

主要参考文献

- 1 Washinton C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 1996; 20(2/3): 131~145
- 2 Ohmukai O. Lipid-NSAID preparation. *Adv Drug Deliv Rev*, 1996; 20(2/3): 203~207
- 3 Takenaga M. Application of lipid microspheres for the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 1996; 20(2/3): 209~219

[王亚敏编译 姚春芳校]

(1997-01-27 收稿)