

甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺长循环脂质体的制备

王 昭^{1,2} 马稳乾^{2,3} 傅经国^{2,4} 陈 涛^{2,5}

¹加拿大力邦制药有限公司 ²陕西省脂质体工程技术研究中心

³西安力邦医药科技有限责任公司 ⁴河南省科学院化学所

⁵西安力邦制药有限公司 陕西西安 710075

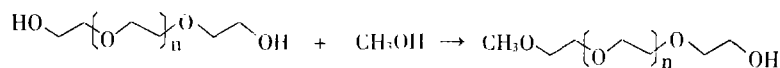
[中图分类号]R94 [文献标识码]A [文章编号]1671-3141(2003)05-0817-04

[摘要] 本实验研究了聚乙二醇磷脂衍生物, ω -甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG)的合成。同时以 DSPE-PEG、卵磷脂和胆固醇为包材,采用薄膜分散-挤压法制备了长循环脂质体。研究了 DSPE-PEG 脂质体的粒径、载药性能、防止脂质体冻干、复溶过程的融合以及在血液中的半衰期。本实验结果证明 DSPE-PEG 长循环脂质体提高了药剂在血液中的存留时间,并对脂质体冻干制剂的质量有非常有利的影响。

0 引言

长循环脂质体是近年发展起来的新型脂质体药物转运系统。主要设计原理是利用聚乙二醇在脂质体表面的空间位阻和有效屏蔽作用,从而阻断或延缓血中的脂蛋白或血蛋白与脂质体的相互作用,减少可能发生的磷脂交换、脂质体泄露、脂质体膜的破坏和溶解。同时聚乙二醇隔离带也阻断或延缓了血蛋白在脂质体表面的吸附,有效阻止了其表面的调理作用,降低 MPS 对脂质体的亲和力,从而达到延长脂质体在血液中的存留时间的效果。聚乙二醇价廉易得、可以大规模生产、分子量易于控制、良好的物理化学性质,同时可以事先将其制备成聚乙二醇的磷脂衍生物,制剂的工艺相对简单等优点,成为目前高分子修饰脂质体的研究重点^[1-7]。本课题组合成了聚乙二醇磷脂衍生物, ω -甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺。研究了聚乙二醇脂质体的制备和在体内存留的性质。考察了聚乙二醇对 pH 梯度法载药的影响以及聚乙二醇对脂质体冻干制剂的保护作用。

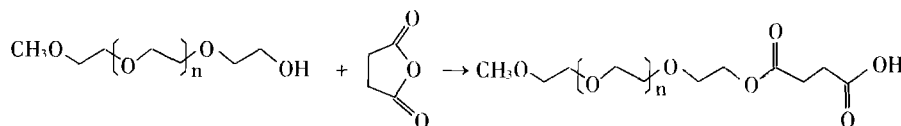
第一步: ω -甲氧基聚乙二醇的合成



聚乙二醇(PEG)

ω -甲氧基聚乙二醇(MePEG)

第二步: ω -甲氧基聚乙二醇丁二酸单酯的合成



ω -甲氧基聚乙二醇(MePEG)丁二酸酐(MePEGS) ω -甲氧基聚乙二醇丁二酸单酯(MePEGS)

1 仪器和试剂

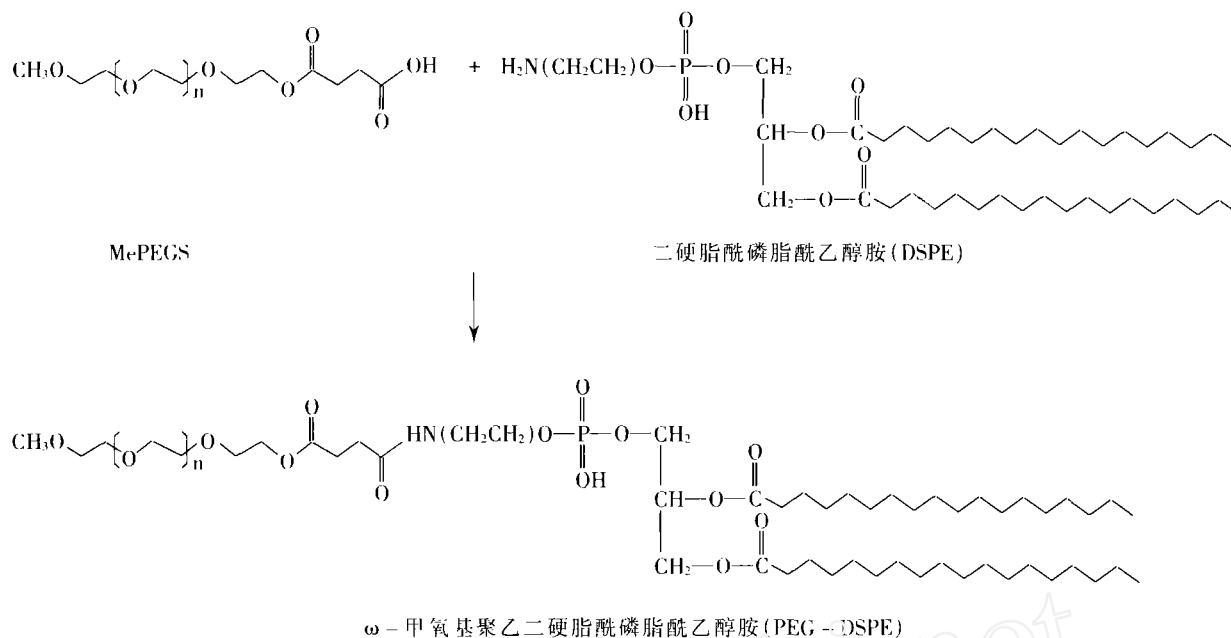
1.1 设备和仪器 Lipex(r) 挤压器(加拿大北方脂质体公司制造);聚碳酸酯滤膜(Nuclepore(r) 100nm, 80nm 滤膜, 美国 Whatman 公司制造);激光散射粒径仪(Nicomp 370 submicron particle sizer, Santa Barbara, CA, 制造)。

1.2 药品和试剂 高纯度蛋黄卵磷脂(含量 98%)和高纯度胆固醇(含量 98%)分别由粗品精制提纯而得。二硬脂酰磷脂酰乙醇胺,用于对照的 ω -甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺纯品(98%)由德国 Lipoid 公司惠赠;其他化学试剂都为商业所能得到的最高纯度,这些试剂未经进一步提纯而直接用于本实验。

2 实验方法

2.1 ω -甲氧基聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺的合成 聚乙二醇磷脂衍生物, ω -甲氧基聚乙二醇二硬脂酰磷脂酰乙醇胺的合成工艺为

第三步:甲氧基聚乙二醇二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)的合成



2.1.1 ω-甲氧基聚乙二醇的合成 聚乙二醇在无水二氯甲烷中与金属钠作用生成聚乙二醇钠,然后与碘甲烷反应即得ω-甲氧基聚乙二醇。双端都反应的ω、ω-二-甲氧基聚乙二醇和未反应的聚乙二醇的反应混合物。硅胶柱层析色谱提纯可以得到纯净的ω-甲氧基聚乙二醇。

2.1.2 ω-甲氧基聚乙二醇丁二酸单酯的合成 将ω-甲氧基聚乙二醇(Me-PEG-2000)、丁二酸酐和催化剂加入盛有二氯甲烷的圆底烧瓶中,磁力搅拌使固体完全溶解后,室温搅拌反应过夜。反应液分别用盐酸水溶液、氢氧化钠水溶液和甲醇水溶液依次洗涤。有机相经无水MgSO₄干燥,过滤除去干燥剂,减压蒸除有机溶剂,残留物以石油醚结晶,收率90%。

2.1.3 ω-甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺的合成 ω-甲氧基聚乙二醇丁二酸单酯先经N-羟基丁二酰亚胺(NHS)活化,然后缓慢滴加入到二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)的三氯甲烷中,加料完毕后继续反应4h,蒸除溶剂,浓缩液在乙醚中结晶。硅胶柱层析色谱提纯可以得到白色粉末状固体的ω-甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺。TLC、NMR和其他不同方法分析比较了作者的合成产物和对照品,确认合成的最终产物是笔者预期的化合物ω-甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺。

2.2 脂质体制备 取适量的磷脂混合物共溶于氯仿/甲醇,加入圆底烧瓶,旋转蒸发除掉有机溶剂形成均匀的混合磷脂薄膜,真空干燥过夜。在含有磷脂膜的圆底烧瓶内加入300mol/L柠檬酸钠缓冲溶液,快速震荡使

磷脂膜水合而溶解,可以间隔地将容器置于55℃水浴中加快磷脂膜水合过程。得到的多层脂质体在55℃用挤压器挤压通过双层100nm孔径的薄膜,即得到所需的大单室脂质体。常规脂质体的磷脂组成为卵磷脂/胆固醇(55:45摩尔比),长循环脂质体的组成是卵磷脂/胆固醇/DSPE-PEG(55:40:5摩尔比)^[8-9]。

2.3 pH梯度载药法制备长循环脂质体药物 取1.9mL空脂质体,加入适量的弱碱性药物,然后用碳酸钠溶液调整混合液的pH到7.5。将混合液于水浴(55~60℃)中加热15min后在室温条件下储存。用Sephadex G-25凝胶柱分离脂质体药物和游离药物,结合分光光度计测定,计算药物的载入量(图2)^[10]。

2.4 长循环脂质体的冻干制剂 将常规脂质体和DSPE-PEG长循环脂质体与10%的甘露醇溶液混合,

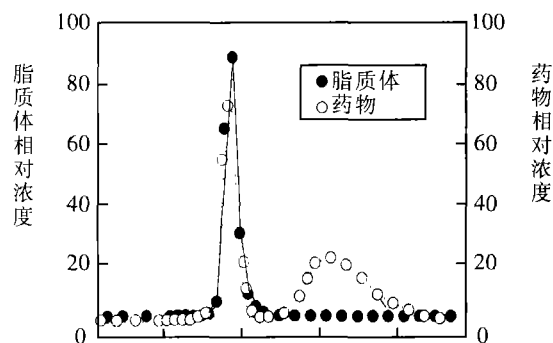


图2 G-25 Sephadex 凝胶柱分析药物的载入量。药物以pH梯度载药法制备,载入的药物的洗脱位置与脂质体的洗脱位置重叠,游离的药物洗脱位置相对滞后。

冷冻到 -40°C , 真空干燥得到疏松的粉末。

2.5 脂质体粒径测定 脂质体样品适量, 生理盐水稀释后, 用激光散射粒径仪 Nicomp 370 submicron particle sizer 测定脂质体粒径及分布。

3 结果

3.1 脂质体的制备及性质 本实验合成了聚乙二醇磷脂衍生物, ω -甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺, 合成产物与对照品的纯度相当。应用薄膜分散法和挤压器成功地制备了聚乙二醇修饰的大单室脂质体, 当挤压所用的膜为 100nm 时, 经过 7 次挤压得到的脂质体的粒径在 $110\sim 130\text{nm}$ 之间。与常规脂质体相比, 聚乙二醇脂质体的粒径相对要小, 但是两者的形态和外观没有根本的区别。聚乙二醇脂质体的粒径和形态见图 3 和图 5。脂质体的制备工艺不受 DSPE-PEG 的影响, 无论是否含有聚乙二醇磷脂衍生物, 磷脂混合物的成膜、水合和挤压各制备步骤都较顺利。由于聚乙二醇的相变温度影响, 脂质体的水合和挤压温度不能太高。可能是由于聚乙二醇的影响, 大单室脂质体的外观较常规脂质体更趋半透明状。

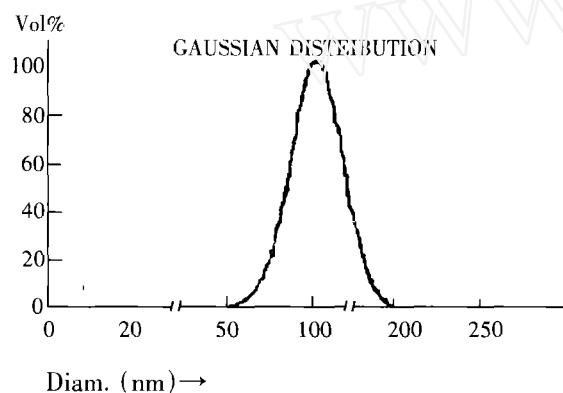


图 3 聚乙二醇物质体的粒径

为了验证聚乙二醇脂质体的长循环性, 本实验同时制备了不含聚乙二醇的卵磷脂脂质体和卵磷脂/胆固醇脂质体。小鼠静脉给药后检测脂质体在血液中的浓度, 卵磷脂脂质体 4h 后仅有 20% 左右存留在血液中, 24h 几乎全部从体内排出。卵磷脂/胆固醇脂质体增加了在血液中的存留时间, 24h 还有 15% ~ 20% 的脂质体在血液循环系统中。加入 5% 的聚乙二醇磷脂衍生物使得脂质体的血液半衰期显著延长, 24h 仍然有 50% 的脂质体存留在血液中(图 4)。

3.2 聚乙二醇对长循环脂质体 pH 梯度载药的影响

应用 pH 梯度法可以将弱碱性药物载入脂质体。本实验考察了加入聚乙二醇后的脂质体对 pH 梯度载药的影响。在相同条件下, 常规脂质体和聚乙二醇脂质体的载

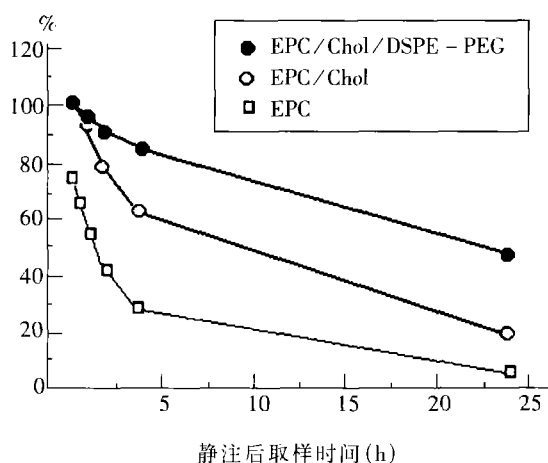


图 4 不同脂质体静注后在血液中的存留浓度

药动力学和最终载药量没有明显差异(表 1)。虽然聚乙二醇在脂质体表面形成“蘑菇云”或“毛刷状”排列。有效地阻断了血蛋白在脂质体表面吸附的能力, 起到了屏蔽脂质体的效果。延长了脂质体在血液中的存留时间的效果。但是聚乙二醇保护层并不影响小分子的穿透。在本实验条件, 测试的药物都可以达到 95% 以上的高包封率。装药后脂质体的粒径没有明显变化。在室温放置, 4h 没有药物渗漏, 各项质量指标都符合要求, 也没有发现体外突释效应的变化。

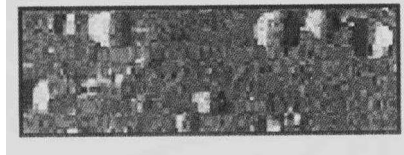
表 1 pH 梯度法制备脂质体药物的药物载药量

药物	常规脂质体	PEG-脂质体
阿霉素	98%	98%
长春新碱	98%	99%
环丙沙星	97%	99%
利多卡因	78%	90%

3.3 聚乙二醇对长循环脂质体的冻干制剂的影响

空白的常规脂质体和聚乙二醇脂质体与 10% 的甘露醇溶液混合, 冷冻干燥都可以得到疏松的粉末。重新水合后检测, 常规脂质体除粒径有微小的增大外, 其他指标均无明显变化。聚乙二醇脂质体的粒径和其他质量指标基本上没有变化。加入 5% mol 的聚乙二醇磷脂衍生物在脂质体的表面形成了空间位阻和有效屏蔽作用, 减少了冷冻干燥过程可能发生的脂质体膜之间的融合。所以聚乙二醇在脂质体的冷冻干燥中起到了脂质体膜的保护作用。聚乙二醇脂质体冻干前和冷冻干燥-重新水合后的形态见图 5。

本实验结果表明我们可以成功地合成聚乙二醇磷脂衍生物, ω -甲氧基聚乙二醇-二-硬脂酰磷脂酰乙醇胺。以这种聚乙二醇磷脂衍生物为包才之一成功地制



冷冻干燥前



冷冻干燥重新水合后

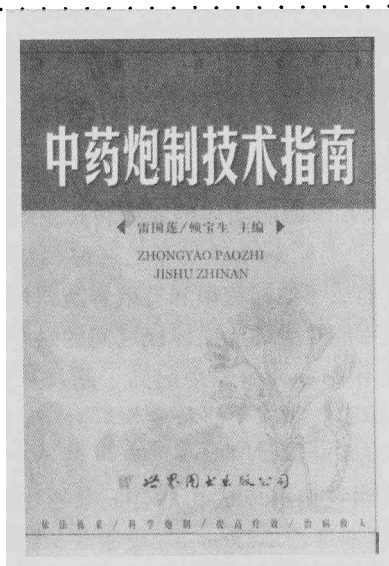
图5 聚乙二醇物质体冻干前和冷冻干燥-重新水合后的形态

备了聚乙二醇修饰的大单室脂质体。聚乙二醇脂质体的粒径和形态、对药物的包封率及其他指标都能达到临床应用的质量要求。特别要提到的是聚乙二醇提高了脂质体冷冻干燥制剂的质量。动物体内实验证明聚乙二醇脂质体显著延长了脂质体的血液半衰期。

参 考 文 献

- 1 Chonn A and Cullis PR. Recent advances in liposome drug delivery systems.. *Current Opinion in Biotech.*, 1995, 6: 698 ~ 708
- 2 陈涛,王九成,傅经国,等. 脂质体药物制剂的研究现状和前景,世界最新医学信息文摘,2003,2(4):721 ~ 728
- 3 Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin : review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 419 ~ 36
- 4 黄圆,段逸松,于波涛,等. 硫酸铵梯度法制备米托蒽醌长循环脂质体,中国药学杂志,2003,37:917 ~ 919
- 5 Needham D, McIntosh TJ and Zhelev DV, Surface chemistry of the sterically stabilized PEG - liposome: General principles, in *Liposomes, Rational desin*, Andrew S, Janoff Ed., 1999, 13 ~ 62, Published by Marcel Dekker AG, New York, NY
- 6 Klibanov AI and Huang L. Long - circulating liposomes: development and perspectives, *J. Liposome Res.*, 1992, 2: 321
- 7 Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y, Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin : review of animal and human studies, *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 419 ~ 436
- 8 Hope MJ, Nayar R, Mayer LD and Cullis PR, Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques, in *Liposome Technology*, G. Gregoriadis, Ed., 1993, 1: 123
- 9 王九成,惠民权,焦亚奇,等. 脂质体抗肿瘤药物:1. 三瓶装阿霉素脂质体注射液制剂研究,世界最新医学信息文摘,2003,2(4):746 ~ 749
- 10 Mayer LD, Cullis PR, and Bally MB, The use of transmembrane pH gradient - driven drug encapsulation in the pharmacodynamic evaluation of liposomal doxorubicin, *J Liposome Res.*, 1994, 4: 529 ~ 553

[收稿日期]2003 - 07 - 20



中药炮制技术指南

本书涵盖了中药炮制的起源与发展,详细介绍了中药饮片质量标准与鉴别方法,收载常用中药 527 种,包括植物药的根及根茎类、茎木类、皮类、叶类、花类、果实和种子类、全草类、藻菌类;动物药、矿物药及其他药,内容精辟、实用性强。