

· 论著 ·

卡巴他赛白蛋白纳米粒的制备及其体外生物相容性评价

万众¹, 孙治国², 鲁莹², 王林辉¹ (1. 海军军医大学附属长征医院泌尿外科, 上海 200438; 2. 海军军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 制备卡巴他赛白蛋白纳米粒(CBZ-BSA-Gd-NP)以降低药物毒性,并评价其体外生物相容性。方法 采用生物矿化法制备 CBZ-BSA-Gd-NP,对其处方工艺进行优化,对粒径、Zeta 电位、载药量等性质进行表征,并采用体外溶血试验考察其体外血液相容性。结果 制得的纳米粒包封率为 63.04%,载药量为 10.51%,平均粒径为(166.1±4.7)nm,粒径的多分散系数(PDI)为 0.256,Zeta 电位为(-18.14±1.16)mV,与卡巴他赛-吐温溶液相比,体外溶血作用显著降低。结论 该方法操作简便,制备的 CBZ-BSA-Gd-NP 载药量高,粒径均匀,体外血液相容性好,增加了药物使用的安全性。

[关键词] 卡巴他赛;白蛋白纳米粒;生物相容性;前列腺癌

[中图分类号] R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)03-0246-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.011

Preparation of cabazitaxel albumin nanoparticles and evaluation of its biocompatibility *in vitro*

WAN Zhong¹, SUN Zhiguo², LU Ying², WANG Linhui¹ (1. Department of Urology, Changzheng Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To prepare cabazitaxel albumin nanoparticles(CBZ-BSA-Gd-NP) to reduce drug toxicity, and to evaluate its biocompatibility *in vitro*. **Methods** CBZ-BSA-Gd-NP was prepared by biomineralization method. The formulation process was optimized, and the properties such as particle size, Zeta potential and drug loading were characterized. The *in vitro* hemolysis characteristics were investigated. **Results** The encapsulation rate of the prepared nanoparticles was 63.04%, the drug loading was about 10.51%. The particle size was (166.1±4.7) nm with the PDI 0.256. The Zeta potential was (-18.14±1.16) mV. The hemolysis effect of CBZ-BSA-Gd-NP *in vitro* was significantly lower than that of cabazitaxel-Tween solution. **Conclusion** The preparation method of CBZ-BSA-Gd-NP in this study is simple, with high drug loading, uniform particle size and good blood compatibility *in vitro*, which will increase the safety for clinical use of the drug.

[Key words] cabazitaxel; albumin nanoparticles; biocompatibility; prostate cancer

前列腺癌是一种常见的男性泌尿生殖系统肿瘤,近年来发病率逐年升高,严重威胁男性健康^[1]。内分泌治疗对于初期前列腺癌患者疗效尚佳,但经过 14~30 个月的中位时间后,大多数患者会逐渐进展为去势抵抗性前列腺癌(CRPC),而此时内分泌治疗已收效甚微^[2]。卡巴他赛(cabazitaxel, CBZ)是经 FDA 批准用于治疗前列腺癌的一种新型紫杉烷类抗肿瘤药物,可通过干扰细胞微管网络起到抗肿瘤作用,它对于 CRPC 有明显的治疗作用,尤其对于多烯紫杉醇治疗无效甚至病情加重的晚期前列腺

癌患者效果显著^[3-4]。然而,已上市的 CBZ 注射剂处方中因增溶剂吐温-80 的加入,而使部分患者在使用过程中容易引发严重的过敏反应,并且 CBZ 本身毒性较大,不良反应较多,肿瘤选择性差,使临床应用受到极大限制,因此需要通过制剂手段提高 CBZ 临床治疗的安全性,达到高效低毒的治疗效果。纳米粒由于可以靶向富集到肿瘤部位,并且结合缓控释药物等优势,可以克服药物选择性差、作用时间短、不良反应严重等缺陷,近年来已成为理想的药物递送载体^[5-7]。而白蛋白基于无毒、无抗原性、生物相容性高、可生物降解等特点,是一种优良的纳米材料^[8]。因此,选择白蛋白纳米粒包载抗肿瘤药物,可以增加药物靶向性,降低毒副作用,增强疗效。故本研究拟以牛血清白蛋白(BSA)为载体,利用 BSA

[作者简介] 万众,硕士研究生, Tel: (021) 81885730, Email: smmuwz@126.com

[通讯作者] 王林辉,教授,研究方向:前列腺癌、肾癌的临床和基础研究, Tel: (021)81872077, Email: wanglinhuic@163.com

和磁性金属钆离子(Gd^{3+})的类生物矿化作用,以及CBZ的疏水性,合成CBZ白蛋白纳米粒,对其处方工艺进行优化,并考察所制备纳米粒的粒径、电位、包封率、载药量等性质,同时对其体外溶血性能进行评价。

1 实验材料

1.1 仪器

Zetasizer Nano 电位/粒度分析仪(Nano ZS ZEN3600,英国马尔文);HPLC-1200 Series 高效液相色谱仪(美国Agilent公司);XBridge C_{18} 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 3.5 μ m, Waters); Thermo Scientific Sorvall 低温超速离心机(美国赛默飞); 85-2 恒温式磁力搅拌仪(国华电器有限公司)。

1.2 试剂

CBZ原料药(批号:M0112A,含量:99.8%,大连美仑生物技术有限公司);牛血清白蛋白(BSA, BioFroxx); $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (大连美仑生物技术有限公司);NaOH和DMSO(国药集团化学试剂有限公司);吐温-80(大连美仑生物技术有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯;其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 卡巴他赛白蛋白纳米粒(CBZ-BSA-Gd-NP)的制备

采用生物矿化法制备CBZ-BSA-Gd-NP。将 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (5 ml, 0.4 mg/ml)缓慢加入到BSA溶液(10 ml, 1 mg/ml)中搅拌(500 r/min)。3.0 min后加入氢氧化钠溶液(5 ml, 0.2 mg/ml),室温下继续搅拌60 min后,加入用DMSO溶解的卡巴他赛溶液(100 μ l, 20 mg/ml),继续搅拌30 min。4 $^{\circ}C$ 离心30 min(10 000 r/min),共离心3次以去除游离药物,去离子水洗涤,收集上清液,测定卡巴他赛的包封率和载药量。

2.2 处方优化

以制得CBZ-BSA-Gd-NP的载药量为评价指标,分别考察制备过程中BSA用量、CBZ投药量和搅拌时间对于纳米粒制备的影响。各因素水平见表1。

结果表明,随着BSA用量的增大,载药量变小,同时粒径随之增大。随着CBZ投药量的增大,载药量逐渐增大,但当投药量为3 mg时,粒径大幅度增加。加主药前,随着搅拌时间增加,粒径逐渐变小,达到一定时间后则不再变化,加主药后的搅拌时间对载药量和粒径的影响不大。按照正交设计法,选择表1中3个因素[BSA用量(A)、CBZ投药量(B)

和加主药前搅拌时间(C)],以载药量为评价指标,采用3因素3水平正交设计优化处方,最终筛选出的最优处方为:BSA用量为10 mg, CBZ投药量为2 mg,加主药前搅拌时间为60 min。按最优处方制得纳米粒包封率约为63.04%,载药量约为10.51%。

表1 CBZ-BSA-Gd-NP 处方优化的因素水平表

水平	因素			载药量 (%)
	A:BSA用量 (m/mg)	B:CBZ投药量 (m/mg)	C:搅拌时间 (t/min)	
1	10	1	30	10.03
2	10	2	60	10.51
3	10	3	90	10.66
4	20	1	60	9.14
5	20	2	90	9.62
6	20	3	30	9.77
7	30	1	90	9.01
8	30	2	30	9.14
9	30	3	60	9.31

2.3 CBZ-BSA-Gd-NP 的表征

2.3.1 粒径和 Zeta 电位

采用Zetasizer Nano 电位/粒度分析仪测定纳米粒粒径及其分布。测得CBZ-BSA-Gd-NP粒径为(166.1 ± 4.7) nm,粒径分布见图1, PDI为0.256,粒径分布较窄。Zeta电位为(-18.14 ± 1.16) mV。

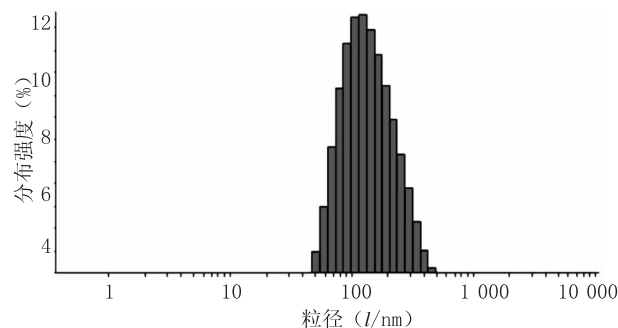


图1 CBZ-BSA-Gd-NP 的粒径分布

2.3.2 包封率和载药量

(1)CBZ 体外含量测定的色谱条件: 色谱柱: C_{18} 柱(3.0 mm × 100 mm, 3.5 μ m); 流动相: 乙腈-水(60 : 40, V : V); 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 $^{\circ}C$; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 5 μ l。

(2)标准曲线的制备: 制备卡巴他赛对照品溶液(1 mg/ml), 用乙腈稀释至 25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、800.0 μ g/ml 的溶液, 精密吸取 5 μ l, 按上述色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标, 溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线为: $Y = 11\ 869X -$

54.522。CBZ在25.0~800.0 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系均良好($r^2=0.9999$)。

(3)CBZ-BSA-Gd-NP包封率和载药量的测定:按“2.1”项下方法,将制备好的纳米超速离心后取上清液测定游离药物含量。按下列公式计算包封率和载药量。包封率(EE) = $(W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$ ($W_{\text{总}}$ 为CBZ初始投药量, $W_{\text{游}}$ 为纳米粒中未被包封的游离药物量);载药量 = $(W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总重}} \times 100\%$ ($W_{\text{总重}}$ 代表处方中载体和药物总量,其余同上)。测得制剂中药物的包封率为63.04%,载药量为10.51%。

2.4 体外溶血实验

2.4.1 2%红细胞混悬液的制备

从大鼠腹主动脉取新鲜血液8 ml,置肝素化学试管中,3 000 r/min离心10 min,弃去上清液。加入约10倍量PBS,摇匀,3 000 r/min离心10 min,弃去上清液,重复3~4次,洗至上清液不显红色为止。将所得红细胞用PBS配制成2%的红细胞混悬液备用^[9]。

2.4.2 溶血率测定

为评价CBZ-吐温-80、CBZ-BSA-Gd-NP的溶血性,将CBZ-吐温-80[以15:57(w/w)的比例溶于吐温-80和13%(w/w)乙醇]以及不同浓度的CBZ-BSA-Gd-NP(溶于0.9%盐水)与红细胞在37℃的悬浮液中孵育2 h,然后以3 000 r/min离心10 min。PBS和蒸馏水分别作为阴性(0%裂解)和阳性对照(100%裂解)。吸取上清液,采用酶标仪于540 nm波长处测量OD值。溶血率用下列公式计算:

溶血率 = $(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{阴性对照}}) / (OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{阴性对照}})$,式中 $OD_{\text{样品}}$ 表示CBZ-吐温-80或CBZ-BSA-Gd-NP样品的OD值, $OD_{\text{阴性对照}}$ 和 $OD_{\text{阳性对照}}$ 分别为阴性对照PBS和阳性对照蒸馏水的OD值,结果见图2。根据文献^[10]报道,溶血率 $\leq 5\%$ 即表示没

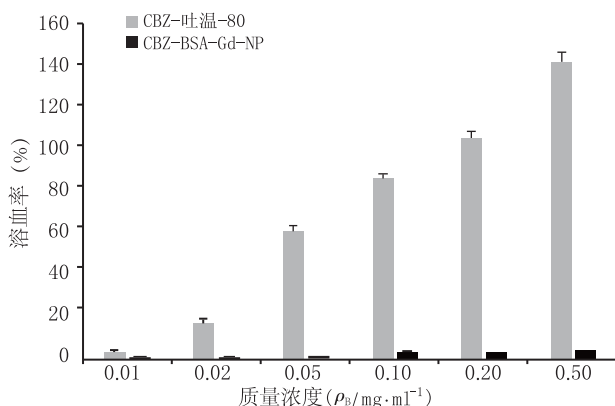


图2 CBZ-吐温-80和CBZ-BSA-Gd-NP体外溶血性能测定

有溶血作用,可达到注射给药要求。由图2可知:CBZ-吐温-80溶液组在浓度为0.02 mg/ml时溶血率已达到18.21%,而CBZ-BSA-Gd-NP组在浓度为0.01~0.50 mg/ml范围内,溶血率均 $\leq 5\%$ 。据此可知,CBZ-BSA-Gd-NP与CBZ-吐温-80组相比,体外血液相容性显著提高,具有用于注射剂开发的潜力。

3 讨论

CBZ是一种新型紫杉烷类抗肿瘤药物,与紫杉醇和多西他赛相比,它与P-糖蛋白的亲合力更弱,因此,对前两种药物耐受的肿瘤细胞具有更强的抑制作用,已广泛用于多西他赛治疗方案无效的激素难治性转移性前列腺癌患者^[11]。然而,由于较差的水溶性,目前已上市的CBZ注射剂中加入了增溶剂吐温-80,使其存在严重过敏反应等不良反应,大大限制了临床应用。因此,本研究制备CBZ白蛋白纳米粒用于提高CBZ的水溶性和体外生物相容性。

本课题所构建的纳米制备方法具有以下优势:①使用白蛋白为载体材料,白蛋白为内源性物质,合成的纳米粒具有安全无毒、生物相容性好等优点;②避免使用吐温-80,显著改善了溶血性;③方法简单,可重复性高;④不使用乳化剂,该研究使用的制备方法为生物矿化法,无需加入乳化剂,更加安全;⑤载药量大。

生物相容性是衡量制剂安全性的一个重要指标,是评价纳米制剂用于临床前研究的最基本要求。溶血试验主要考察材料与血液接触后,是否会引起血液渗透压改变从而导致溶血,由于CBZ临床上市制剂因吐温-80的加入存在溶血问题的隐患,因此,本研究比较了CBZ白蛋白纳米粒和CBZ-吐温体外溶血性能的差异。结果表明,所制备的白蛋白纳米粒具有良好的体外血液相容性。

4 总结

本实验在采用生物矿化法制备CBZ-BSA-Gd-NP的基础上,以载药量、包封率和粒径为考察指标,采用正交试验法对纳米粒处方工艺进行优化,最终按照最优处方制得的纳米粒包封率为63.04%,载药量约为10.51%,平均粒径为 $(166.1 \pm 4.7)\text{nm}$,显著改善了其水溶性;与CBZ-吐温-80溶液相比,制备的纳米粒体外溶血作用显著降低,具有良好的体外生物相容性,为CBZ临床应用的剂型改进提供了良好的思路。

对两种不同加水方法实验结果进行统计分析,本实验的吸水系数与厂家推荐公式计算的系数之间有较大差异,本实验吸水系数法得到的出液量更接近实际需液量,且误差值相对集中,在实际生产中更容易控制,产生误差的原因可理解为饮片在煎煮条件下继续增加的吸水量。与文献记载部分质地坚实的根茎类、种子类等含淀粉、黏液质多的药材,在浸泡时吸水量小但在煎煮时吸水量大^[3]结论相吻合。从表8的对比结果可以看出,饮片传统煎煮条件的饮片吸水量与常温实验条件比较,吸水量增加明显,各品种增加吸水量数值存在较大差异,最小差异值(车前草)为0.085,最大差异值(仙鹤草)达到3.110,在工艺条件相对固定的情况下,通过增加加水量公式修正参数,如调节系数 P 、损耗量 T 等来修正加水量的适用性,中药饮片大批量、社会化、机器煎煮可以通过饮片加水量公式实现软件计算加水量。

4 结论

中药汤剂在现代中医临床中应用普遍,汤剂的质量直接影响临床疗效。汤剂在煎煮时以水为溶媒,加水量是影响饮片有效成分溶出率的关键因素。本研究通过对107味全草类中药饮片吸水系数的测定以及对调节系数、损耗量的验证实验,初步摸索了利用计算机软件,通过吸水系数计算加水量指导煎药机生产加水量的可行性。由于本研究只测定了常用全草类中药饮片在室温条件下的吸水系数,虽然能够利用计算公式指导实际生产加水量化,但仍

具有一定局限性及差异性。为进一步深入研究推进中药汤剂标准化、规模化、自动化生产加工,仍需对其他类常用中药饮片在常温下、煎药机煎煮条件下的吸水系数进行测定,并对两种实验条件下的结果进行深入分析,与实际生产工艺条件比较,探索企业个性化加水量数学模型,将单味中药饮片两种不同工艺条件下的吸水系数作为饮片的属性之一输入计算机信息系统,根据建立的加水量数学模型,通过大量的生产实践验证,不断优化各关键工艺参数及软件算法,利用计算机信息软件程序,计算处方总的加水量,提高煎出率、降低生产成本、提高汤剂质量、推进中药汤剂的生产标准化。

【参考文献】

- [1] 石婷. 中药汤剂制备与服用的科学化[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(25): 3357-3358.
- [2] 穆兰澄, 仝小林, 刘峰, 等. 中药饮片煎煮过程中吸水量的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 7-8.
- [3] 王抒, 黄翠. 关于中药汤剂煎煮时对水量的要求[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(1): 108.
- [4] 戴丽莉, 葛朝伦, 孙奇, 等. 中药汤剂煎药机加液量数学模型的初步研究[J]. 中国药房, 2016, 27(1): 18-22.
- [5] 蒋炬辉. 应用煎药机煎药时药量与加水量关系的初步研究[J]. 海峡药学, 2014, 26(9): 98-99.
- [6] 陈平亚. 中药煎煮方法与煎取量间关系的探讨[J]. 中国民康医学, 2007, 19(12): 496-497.
- [7] 李彬. 应用新型煎药机煎药时对加水量的实验研究[J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(1): 68-70.

[收稿日期] 2018-12-09 [修回日期] 2019-03-04

[本文编辑] 陈盛新

(上接第248页)

【参考文献】

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. CA; Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] 董隽. 激素难治性前列腺癌对多西他赛耐药机制的研究进展[J]. 中华泌尿外科杂志, 2011, 32(2): 138-140.
- [3] 马琪, 李永红, 杨斌, 等. 前列腺癌化疗安全共识[J]. 现代泌尿外科杂志, 2018, 23(2): 85-92.
- [4] 周爱萍, 房虹, 李长岭, 等. 去势抗拒前列腺癌治疗新药卡巴他赛[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(19): 2229-2231.
- [5] LEE K C, MATURO C, RODRIGUEZ R, et al. Nanomedicine-nanoemulsion formulation improves safety and efficacy of the anti-cancer drug paclitaxel according to preclinical assessment[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2011, 11(8): 6642-6656.

- [6] 杨恩慈, 李苾清, 林长征, 等. 改善紫杉醇水溶性方法的研究进展[J]. 中南药学, 2011, 9(8): 615-618.
- [7] 连建豪, 陈建明. 纳米给药系统在难溶性药物制剂研究中的应用[J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(8): 441-446.
- [8] 王梦迪, 何广卫. 靶向递药系统白蛋白纳米粒的研究进展[J]. 安徽医药, 2013, 17(10): 1649-1651.
- [9] 黄娜, 高慧敏, 陈两绵, 等. 金银花与山银花的体外溶血作用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 6-12.
- [10] 黄伟忠, 蔡泽府, 张清民. 紫外分光光度法测定注射剂溶血的方法研究[J]. 今日药学, 2016, 26(10): 713-716.
- [11] 郝斌, 马志方. 去势抵抗性前列腺癌化疗及其新进展[J]. 临床泌尿外科杂志, 2015, 30(1): 83-87.

[收稿日期] 2019-01-04 [修回日期] 2019-04-23

[本文编辑] 李睿旻