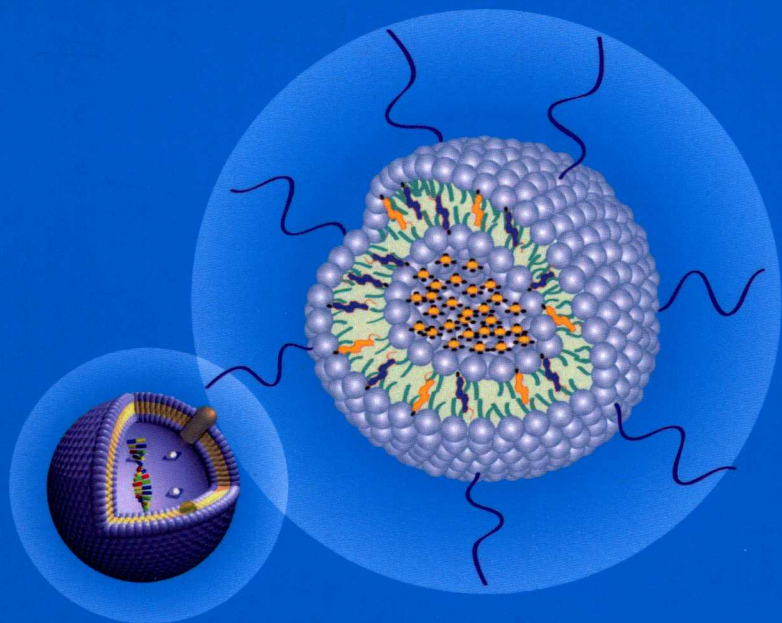




| 孙维彤 / 著 |

抗肿瘤药物 脂质体研究

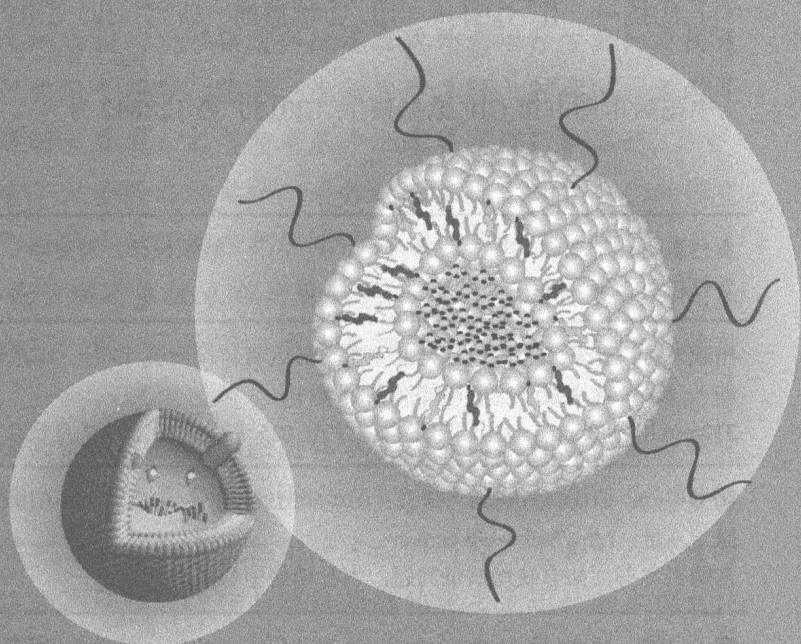
Studies on liposomes as
anti-tumor agent



化学工业出版社

抗肿瘤药物 脂质体研究

Studies on liposomes as
anti-tumor agent



化学工业出版社

· 北京 ·

本书在介绍脂质体及其在抗肿瘤治疗领域的概况及进展的基础上,重点论述了作者在脂质体技术应用在抗肿瘤药物领域的基础研究成果。主要内容包括:脂质体概述;脂质体在抗肿瘤药物领域的最新研究成果、应用特点和研究现状;抗肿瘤药物脂质体的制备方法、稳定性研究和质量控制等内容,尤其是对鱼精蛋白凝聚法分离载药脂质体与游离药物的适用范围的探讨;抗肿瘤药物脂质体处方及工艺的优化、体外释药机制、不同粒径脂质体体内动力学以及体内组织分布。

本书可供药物化学、医学、肿瘤学、免疫学等相关学科的科研工作者及从事脂质体技术与开发的工作人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

抗肿瘤药物脂质体研究/孙维彤著. --北京:化学工业出版社, 2015.8

ISBN 978-7-122-24286-0

I. ①抗… II. ①孙… III. ①抗癌药—研究 IV. ①R979.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第128842号

责任编辑:李晓红

装帧设计:刘丽华

责任校对:宋 玮

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:北京京华虎彩印刷有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张8¼ 字数125千字 2015年7月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:48.00元

版权所有 违者必究

前 言

恶性肿瘤是严重危害人类健康的重大疾病之一，目前，化学药物治疗仍然是必不可少的治疗方法，但抗肿瘤药物的严重不良反应受到极大的关注。研究者们开发研究了多种新型药物传递系统，来解决抗肿瘤药物作用选择性不高，且具有不同程度不良反应的问题。脂质体可同时包裹脂溶性和水溶性药物，特别是难溶的抗肿瘤药物，显著降低抗肿瘤药物的不良反应，促进药物吸收，增加血药浓度并延长作用时间，明显提高抗肿瘤药物作用的靶向性。近年来，脂质体作为抗肿瘤药物载体的研究十分活跃，为抗肿瘤药物的治疗提供了新的思路。

目前，国内外已有一些脂质体技术在药物递送方面应用的著作，但鲜有专门介绍抗肿瘤药物脂质体的著作。随着脂质体、纳米技术的进步，以一种合理的方式阐述抗肿瘤药物脂质体的研究概况及进展，并结合成功研发的实例，介绍脂质体技术在抗肿瘤治疗方面的应用是很有必要的，这将便于药学、化学、生物学医学工程、肿瘤学、医学等领域的人员的理解和应用。本书即是基于上述原因进行编撰的。

笔者在参考了大量国内外文献、著作的基础上，结合自己的研究成果与经验，介绍脂质体及其在抗肿瘤治疗领域的概况及进展，并重点论述了笔者关于脂质体技术在抗肿瘤药物应用领域的基础研究成果。主要内容如下：第一章和第二章为基础篇，主要概述脂质体的发展、形成原理、分类、理化性质、脂质体给药途径、抗肿瘤作用特点与作用机制等方面的内容，介绍脂质体在抗肿瘤药物领域的最新研究成果和研究现状；第三章主要结合科研实例，介绍抗肿瘤药物脂质体的制备方法、稳定性研究和质量控制等方面的内容，尤其引入笔者对鱼精蛋白凝聚法分离载药脂质体与游离药物的适用范围的初次探讨；第四章以笔者科研研究为主线，阐述抗肿瘤药物脂质体的处方与制备

工艺的优化、体外释药机制、不同粒径脂质体体内动力学以及体内组织分布，并以肿瘤药物为主线，探讨药物脂质体口服促吸收机制等方面的内容。

脂质体技术在抗肿瘤治疗研究方面的发展日新月异，笔者尽管做了较大的努力，力图反映较新的理论和进展，但仍难以全面介绍。由于笔者水平和实际经验有限，书中疏漏在所难免，恳请广大同仁和读者批评指正。

本书得以出版，首先要感谢恩师山东大学药学院张娜教授，是先生指引我走向了科研之路；感谢佳木斯大学（药学院）药学学科及药学专业的支持。此外，本书在编写过程中还参阅了许多专家、学者、科研人员的研究论文，在此向各位同仁表示诚挚的谢意。

著 者

2015年5月

第一章 脂质体概述

1

第一节	脂质体的组成与结构	2
一、	脂质体的主要成分	3
二、	常用的脂质体材料	5
第二节	脂质体分类	8
一、	按脂质体的结构类型分类	8
二、	按脂质体荷电性分类	10
三、	按给药途径分类	11
四、	按脂质体性能分类	12
第三节	脂质体的理化性质	23
一、	相变温度	23
二、	膜的通透性	24
三、	膜的流动性	25
四、	脂质体荷电性	25
五、	脂质体粒径和粒度分布测量	25
第四节	脂质体作为抗肿瘤载体的应用概况	26
	参考文献	33

第二章 脂质体与药物的相互作用

36

第一节	脂质体作用特点	36
一、	脂质体剂型的特点	36
二、	抗肿瘤药物脂质体的给药优势	37
第二节	脂质体的作用机制和给药途径	38

一、脂质体与细胞的相互作用	39
二、脂质体作用机制	42
三、脂质体的给药途径	43
参考文献	46

第三章 脂质体的制备与质量评价

48

第一节 脂质体的制备	48
一、薄膜分散法	48
二、逆相蒸发法	53
三、乙醇（乙醚）注入法	54
四、冷冻干燥法	54
五、化学梯度法	55
第二节 脂质体的质量评价	56
一、包封率与载药量	56
二、鱼精蛋白凝聚法分离载药脂质体与游离药物	59
三、形态、粒径与电位	67
四、稳定性	68
参考文献	73

第四章 抗肿瘤药物脂质体研究

76

第一节 处方和制备工艺	76
一、普通脂质体处方前研究	76
二、普通脂质体优化处方和制备工艺	78
三、主动靶向脂质体的表面修饰	83
第二节 体外释药机制	85
一、脂质体在 PBS (pH=7.4) 中的释放	86
二、脂质体在人工胃液 (pH=1.2) 中的释放	87
三、脂质体在人工肠液 (pH=6.8) 中的释放	88
第三节 不同粒径脂质体体内动力学以及体内组织分布	89
一、口服脂质体体内药物动力学研究	92

二、静脉注射脂质体	100
三、不同给药途径对脂质体体内行为的影响	106
第四节 促进口服吸收机制	109
一、不同粒径脂质体吸收影响	110
二、其他因素对脂质体口服吸收的影响	112
三、脂质体胃肠道稳定性	116
参考文献	120

第一章

脂质体概述

脂质体（liposome）最初是由英国学者 Bangham 和 Standish 将磷脂分散在水中进行电镜观察时发现的^[1]。磷脂分散在水中自然形成多层囊泡，每层均为脂质的双分子层；囊泡中央和各层之间被水相隔开。后来将这种由脂质双分子层组成，内部为水相的闭合囊泡称为脂质体（见图 1-1）。由于脂质体的结构类似生物膜，故又称为人工生物膜（artificial biological membrane），脂质体的大小从几十纳米到几十微米，在脂质体的水相和膜内可以包裹多种物质。由天然膜成分组成的脂质体，其脂质体膜的双层结构原则上与天然细胞膜一样，另外，脂质体还可以完全由人工合成的脂质组成，以改善它们的化学性质和生物学性质^[3]。

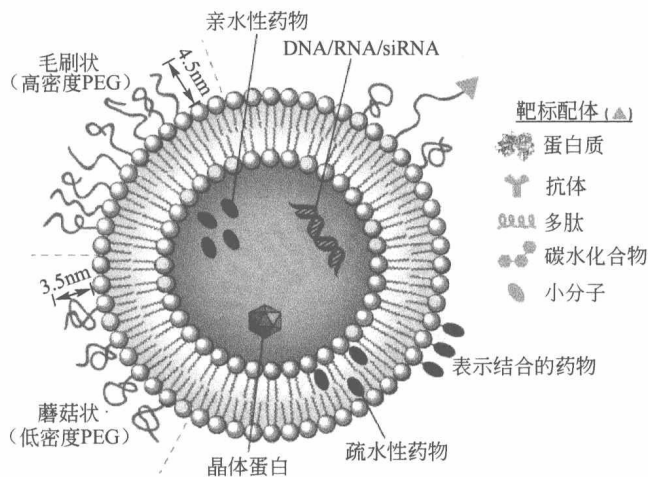


图 1-1 脂质体结构^[2]

脂质体研究是当前一个十分活跃的领域。脂质体最早是指天然脂质化合物悬浮在水中形成的具有双层封闭结构的泡囊，现在也可以由人工合成的磷脂化合物来制备。随着膜模拟化学的发展，人们在水溶液中用超声等方法处理表面活性剂分子，也获得了与脂质体结构相同的囊泡（vesicle），一般也称为类脂质体（niosome）。由于类脂质体与脂质体结构相似、性质相近，常与脂质体一起研究。当前，脂质体的研究主要集中在四个领域：模拟膜的研究；药物的可控释放和体内的靶向给药；基因及其他生理活性物质向细胞内的转运；皮肤及化妆品等日用工业品的基质。近年来，脂质体作为药物载体的研究愈来愈受到重视，这方面的研究进展非常迅速，有着非常吸引人的应用潜力^[4]。

第一节 脂质体的组成与结构

脂质体系由主要成分磷脂为膜材及附加剂组成，磷脂为两亲性物质，其结构上同时含有亲水基团和亲油基团，如图 1-2 所示。

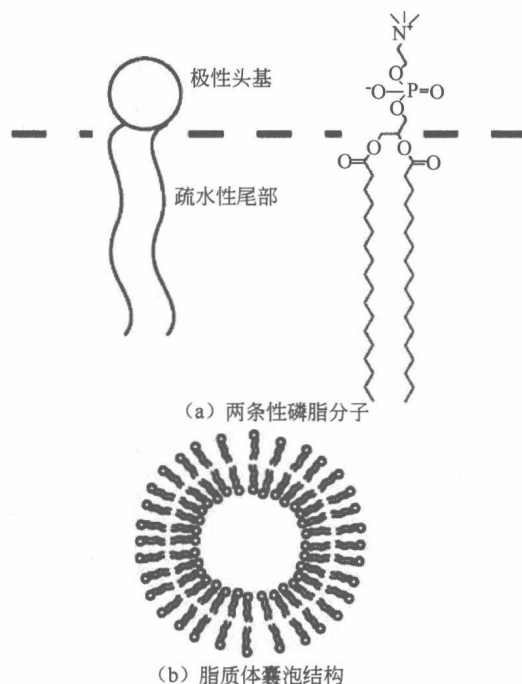


图 1-2 磷脂分子结构^[4]

基的结构如何，它们在水中均能自发地形成脂质双分子层。

由于这种典型的双亲分子特性使脂质体兼具有亲油和亲水性，因此，脂质体作为药物或其他物质的载体，其包裹范围是很广的，亲脂性物质、两性物质以及水溶性成分都可以被包裹。从某种角度上说，只有两类物质难以被囊化，一类是在水相和有机相均不溶解的物质；另一类是在水相、油相中的溶解度都很大的物质，由于它们极易渗漏，故亦难以被囊化。又因磷脂是生物膜的组成成分，生物体内存在有分解酶，很容易代谢，因而脂质体又具有生物降解性和生物相容性。大量的研究工作表明，脂质体进入体内主要被网状内皮系统（reticular endothelial system, RES）吞噬而激活机体的自身免疫功能，并改变被包封药物的动力学性质和体内分布，使药物主要在肝、脾、肺和骨髓等组织器官中累积，从而提高药物的治疗指数，减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性。因此，脂质体在许多疾病尤其是癌症的治疗中显示了明显的优越性。

附加剂常用的有胆固醇、十八胺、磷脂酸等。胆固醇可以调节双分子层的流动性、通透性等；十八胺、磷脂酸可以改变脂质体表面电荷的性质。

胆固醇（cholesterol）也属于两亲物质，其结构上亦具有亲油和亲水两种基团。从胆固醇的结构来看，其亲油性较亲水性强。用磷脂与胆固醇作脂质体的膜材时，常常先将类脂质溶于有机溶剂中配成溶液，然后蒸发除去有机溶剂，在器壁上使成均匀的一类脂质薄膜，此薄膜是由磷脂与胆固醇混合分子相互间隔定向排列的双分子层所组成的。磷脂与胆固醇的排列方式：磷脂分子的极性端呈弯曲的弧线，形似“手杖”，与胆固醇分子的极性基团相结合，故亲水基团上接有两个亲油基团，其中一个是磷脂分子中的烃基侧链，即磷脂结构简式中的 R 、 R' 基团，另一个是亲油基团，即胆固醇结构中的亲油基部分。

当薄膜形成后，加入磷酸盐缓冲液振荡或搅拌即可形成单室或多室的脂质体。在不断搅拌中，使水膜中容纳大量的水溶性药物，而脂溶性药物则结合于双分子层的亲油基部分。磷脂分子悬浮在水溶液中聚集形成脂质体时，它的两条疏水链一个挨一个地指向内部，头基在

膜的内外两个表面上。磷脂双层构成一个个封闭的小室，内部包含着一定体积的水溶液。小室中的水溶液被磷脂双层包围而独立，磷脂双层形成的泡囊又被水相介质分开。脂质体可以是单层的封闭双层结构，称为单室脂质体结构；也可以是多层的封闭双层结构，称为多室脂质体结构。在显微镜下，脂质体的外形除了常见的球形、椭球形外，还会有长管状结构，直径变化从几纳米到零点几个毫米，而且各种大小、形状和结构的脂质体可以共存。

二、常用的脂质体材料^[5,6]

1. 中性磷脂

磷脂酰胆碱（phosphatidyl choline, PC）是最常见的中性磷脂（neutral phospholipids）。卵磷脂和大豆磷脂的组成成分主要以磷脂酰胆碱为主。磷脂酰胆碱有天然和合成两种来源，它们很容易从蛋黄和大豆中提取，从牛心脏和脊髓提取比较困难。磷脂酰胆碱是许多细胞膜的主要磷脂成分，它们也是脂质体的主要组成部分。与其他磷脂比较，它具有价格低、中性电荷、化学惰性等性质。天然来源的 PC 是一种混合物，每一种 PC 具有不同长度、不同饱和度的脂肪链。植物性 PC 的脂肪链具有高度不饱和性，而动物性 PC 的脂肪链大部分是饱和的。合成的磷脂酰胆碱有二棕榈酰磷脂酰胆碱（dipalmitoyl phosphatidyl choline, DPPC）、二硬脂酰磷脂酰胆碱（distearoyl phosphatidyl choline, DSPC）、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（dimyristoyl phosphatidyl choline, DMPC）等。

除了 PC 外，其他中性磷脂还有鞘磷脂（sphingomyelin, SM）或烷基醚磷脂酰胆碱类似物。在鞘磷脂结构中，酰胺键和羟基基团之间形成氢键相互作用。因此，与 PC 相比，较鞘磷脂具有更高秩序的胶相。

另一种较常见的中性磷脂是磷脂酰乙醇胺（phosphatidyl ethanolamine, PE），这种脂质具有一个不可置换的胺基团，在中性 pH 条件下发生质子化。它与磷脂酰胆碱比较，有两个不同点：①它的头部基团比磷脂酰胆碱的小；②它在膜上与其邻近基团相互作用，发生

氢键结合。饱和 PE 比 PC 的相变温度高 20 °C。非饱和 PE 与 PC 的相变温度相似,在低 pH 值情况下,由于 PE 的氮发生质子化,氢键结合减弱,因而饱和 PE 的相变温度亦与 PC 相似。PE 由于头部基团小,容易形成非双层构型。PE 分子形成长的圆柱状结构,头部基团朝向中心,这种结构被称为六角相(hexagonal phase)。所有的 PE 在主要的胶-液转换温度以上时转变成六角相。在室温下,所有合成的 PE 以及饱和的 PE 形成双层胶相,而非饱和的 PE 形成六角相(非脂质体)。非饱和的 PE 与其他磷脂如 PC 混合可以形成稳定的双层相,以防转换成六角相。然而如果稳定脂质的浓度低,形成双层后易发生相分离,在板层结构中形成六角相或反向胶束(inverted micelle structure)。在自然界,PE 的酰基链的长度不同且呈高度不饱和状态,这提示 PE 参与了生物系统中膜脂质的非双层结构。

2. 负电荷磷脂

负电荷磷脂(negatively-charged phospholipids)又称为酸性磷脂。制备脂质体常用的负电荷脂质有磷脂酸(phosphatidic acid, PA)、磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerol, PG)、磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol, PI)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, PS)、双鲸蜡磷脂酸(dicetylphosphate, DCP)等。在负电荷(酸性)磷脂中,有三种力量共同调节双层膜头部基团的相互作用,这三种力即空间屏障、氢键和静电荷。这样,对于二棕榈酰磷脂酰甘油(dipalmitoyl phosphatidyl glycerol, DPPG),在 pH=7.0 时,甘油基团与非质子化的静电斥力,使其相变温度低于二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC) 10 °C,相反,二棕榈酰磷脂酸(dipalmitoyl phosphatidic acid, DPPA)在中性 pH 情况下,有一个小的头部基团和一个质子,像 PE 一样能发生氢键结合,引起纯的 DPPA 双层膜相变温度升高,在高和低 pH 值情况下,尤其在高 pH 值情况下,静电斥力使头部基团分开,相变温度降低。

3. 正电荷脂质

制备脂质体所用的正电荷脂质(positivity-charged lipids)均为人工合成产品,目前常用的正电荷脂质有硬脂酰胺(sterylamine, SA)、胆固醇衍生物等。

正电荷脂质制备的脂质体在基因的传递系统中应用非常普遍。常用的带正电荷的胆固醇衍生物有 3β -[N -(N' , N' -二甲基氨基乙基)氨基甲酰基]胆固醇 { 3β -[N -(N' , N' -dimethylaminoethane)carbamoyl] cholesterol, DC-cho}、 N -[1-(2,3-二油酰基)丙基]- N,N,N -三乙胺氯 (DOTMA)、2,3-二油酰氧- N -[2-(精胺酸基酰胺)乙基]- N,N -二甲基-1-丙基-三氟乙酸铵 (DOSPA)、1,2-二油酰氧丙基- N,N,N -三甲基溴化铵 (DOTAP) 等。

4. 胆固醇

胆固醇 (cholesterol, Ch) 是自然界膜中的另一类重要的组成成分。它是一种中性脂质, 亦属于双亲性分子, 但是亲油性大于亲水性。它在各类动物细胞的质膜中含量较高, 而在植物细胞质膜中及细胞器的膜系中含量较少。由于胆固醇本身相聚合的能量较大, 故常不与蛋白质结合, 而主要与磷脂相结合, 阻止磷脂凝集成晶体结构。它趋向于减弱膜中脂质与蛋白质复合体之间的连接, 它像缓冲剂一样, 起着调节膜结构流动性的作用。胆固醇掺入脂质体脂双层引起囊泡性质变化。胆固醇本身不形成脂质双层结构, 但它能以高浓度的方式掺入磷脂膜。在天然膜中, 胆固醇与磷脂的分子数比例从 0.1~1 依赖于解剖和细胞定位。胆固醇作为两性分子, 能镶嵌入膜, 羟基基团朝向亲水面, 脂肪族的链朝向并平行于磷脂双层中心的烃链。当胆固醇达到一定的浓度, 酰基链和胆固醇结合占领膜的部分大于或等于 PC 头基团占领的部位, 这样含有高浓度胆固醇的 PC 膜并不出现链的倾斜。在 PC 膜上加入胆固醇对相变温度具有限定作用, 在 DPPC 中加入 33% 胆固醇, 相变温度从 41 °C 升到 44 °C, 然而随着胆固醇浓度的增加, 胆固醇可以使相变温度变化为零。摩尔分数为 50% 的胆固醇可以改变接近相变温度时的膜的流动性, 在相变温度以下, 有序的胶相流动性增加, 在相变温度以上时, 降低酰基链的自由度使脂质双层排列紧密, 引起膜流动性降低。这种流动性变化与膜的通透性变化相平行, 在温度高于相变温度时膜的通透性降低, 低于相变温度时膜的通透性增加。

在脂质混合物组成的膜中加入胆固醇与单一脂质的情况一样, 以同样的方式改变通透性和流动性特征, 在混合物中产生相分离, 胆固

醇主要与具有低相变温度的成分相互作用，胆固醇对某些脂质的作用大于另一些脂质的机制尚未明了。

5. 大豆甾醇及其葡萄糖苷

大豆甾醇葡萄糖苷(SG)是从经提炼豆油的大豆残渣中分离出来的甾醇葡萄糖苷的混合物，SG 主要是由 β -谷甾醇(β -sitosterol 3- β -D-glucoside)、菜油甾醇(campesterol β -D-glucoside)、豆甾醇(stigmasterol β -D-glucoside)及菜籽甾醇(brassicasterol β -D-glucoside)的 D-葡萄糖苷组成的。大豆甾醇(soybean sterol, SS)是 SG 去葡萄糖残基的水解产物。SS 与 Ch 的结构相似，SS 能提高脂质体膜的稳定性，其膜的稳定性作用大于 Ch；SG 能提高脂质体的肝脏靶向性。SS、SG 为纯天然产物，较安全，来源丰富，价格便宜。

6. 非磷脂

1989 年，Micro-Vesicular System (MVS) 公司发明了一种称为 novasome 的新型脂质体，其脂双层主要成分为聚氧乙烯脂肪醇醚类的表面活性剂，商品名为苜泽(brij)。由于是非磷脂(non-phospholipid)组成的脂质体，统称为非磷脂脂质体(non-phospholiposomes)，组成非磷脂脂质体的表面活性剂称为非磷脂。

第二节 脂质体分类

脂质体的粒径介于 20 nm 到几微米之间，其膜厚度约为 5 nm。纽约科学委员会(The New York Academy of Science)在 1977 年根据脂质的粒径和脂质膜层数将脂质体分为小单层脂质体(small unilamellar vesicles, SUV)、大单层脂质体(large unilamellar vesicles, LUV)、多层脂质体(multilamellar large vesicles, MLV)三类。目前，其定义的内涵业已有所拓展^[7]。

一、按脂质体的结构类型分类

1. 单层脂质体

单层脂质体(unilamellar vesicles)是由一层双分子脂质膜形成的

囊泡, 又分为小单层脂质体 (small unilamellar vesicles, SUV) 和大单层脂质体 (large unilamellar vesicles, LUV)。

SUV 的最小直径约为 20 nm。由于水溶液中的离子强度和膜的脂质组成不同, 最低限度略有差异。由于脂质体的粒径小, 包封容积 (每摩尔脂质形成的囊泡中包裹的水相体积, 单位为 L/mol 或 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$) 相对较低; 而且小单层脂质体的平均直径小于 50 nm, 与其他类型脂质体的区别在于其膜的高曲率及其形成的高张力。用卵磷脂以超声波法制备的脂质体可能是目前最小的单层脂质体, 平均粒径为 23 nm, 其双分子层膜外面一层的脂质大约是内层脂质的两倍。脂质双分子层的体积大约是内部水相体积的 4.5 倍。

由于小单层脂质体上述的这些性质, 以其作为膜模型来讨论尚有一定的局限性。脂质体的变形性导致膜的亚稳态, 使膜有相互融合的趋势、与大分子相互作用的趋势, 同时, 膜对亲水分子的通透性较高。单室脂质体内部水相体积很小的直接结果是对水溶性分子的包封率低, 而且小的直径, 造成脂质在膜内外的分布不均匀, 酰基链暴露部分较多, 易发生脂质的融合和聚集, 因而作为药物载体受到限制。然而, 作为药物载体, 体积较小的单层脂质体具有较好的组织器官分布优势。体积大的脂质体注射进入体内后, 通常被肝脏、脾脏等器官摄取, 器官中的毛细血管内皮呈网状 (网状内皮系统), 内皮细胞间有 100~1000 nm 的孔, 小单层脂质体可以部分地从毛细血管中穿过或从其他器官的内皮细胞间隙通过, 进入周围组织中。而且, 由于 SUV 的粒径小, 网状内皮系统 (RES) 的捕获相对较少, 一定程度上会延长脂质体在体内的循环时间。

LUV 的直径一般大于 100 nm, LUV 与 SUV 相比, 对水溶性药物的包封率高, 包封容积大。直径大, 几乎没有膜张力, 因此, 显示出较高的储藏稳定性。采取适当的制备方法, 可以制得粒径均匀的脂质体, 加之只有一层双分子层, 使大单室脂质体成为生物膜的合适模型。内部水相与脂相相比, 具有较高的体积比, 其对水溶性药物的包封总量也较脂溶性药物的比例高^[8]。