

新型肺靶向多西他赛脂质体在原位肺癌模型兔中的药动学研究[△]

王丽娟^{1*},李睿²,车珂科³,余瑜⁴(1.重庆医药高等专科学校药学院/重庆药物制剂工程中心,重庆 401331; 2.重庆药友制药有限责任公司,重庆 401121;3.重庆市人民医院药学部,重庆 400014;4.重庆医科大学药学院,重庆 400016)

中图分类号 R969.1;R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)15-1835-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.15.09



摘要 目的 研究新型肺靶向多西他赛脂质体(DTX-LP)在原位肺癌模型兔中的药动学行为。方法 采用超高效液相色谱-二级串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定DTX在兔血浆中的含量,并进行方法学考察。采用胸腔微创穿刺术制备原位肺癌模型兔,然后随机分为多西他赛注射液(DTX-IN)组和DTX-LP组,耳缘静脉注射给予相应药物,给药剂量均为1.0 mg/kg(以DTX计),然后于5、15、30、60、90、120、240、480 min时取血,测定血浆中DTX浓度。采用DAS 3.3软件进行拟合与分析,并计算药动学参数。结果 本研究所用UPLC-MS/MS法的准确度、精密度良好,符合生物样品分析要求。与DTX-IN组比较,DTX-LP组的药-时曲线趋势较平缓,各时间点的血药浓度更低, c_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0-480\text{min}}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著降低($P<0.05$)。结论 DTX-LP在血浆中的暴露量较DTX-IN降低,提示其能快速地体循环中分布到肺靶器官。

关键词 多西他赛;脂质体;原位肺癌模型;药动学

Study on pharmacokinetics of novel lung-targeted Docetaxel liposome in in-situ lung cancer model rabbit

WANG Lijuan¹, LI Rui², CHE Keke³, YU Yu⁴(1. School of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College/Chongqing Engineering Research Center of Pharmaceutical Sciences, Chongqing 401331, China; 2. Yaopharma Co., Ltd., Chongqing 401121, China; 3. Dept. of Pharmacy, Chongqing General Hospital, Chongqing 400014, China; 4. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the pharmacokinetic behavior of novel lung-targeted Docetaxel liposome (DTX-LP) in in-situ lung cancer model rabbit. **METHODS** The content of DTX in rabbit plasma was determined by UPLC-MS/MS, and methodology investigation was conducted. in-situ lung cancer model rabbit was made by the ultra-minimal invasive percutaneous puncture inoculation method. Model rabbits were randomly divided into Docetaxel injection (DTX-IN) group and DTX-LP group. The rabbits were given relevant medicine via ear vein at a dose of 1.0 mg/kg (calculated by DTX); blood was taken at 5, 15, 30, 60, 90, 120, 240 and 480 minutes to measure the concentration of DTX in plasma. DAS 3.3 software was adopted for fitting and analysis, and to calculate pharmacokinetic parameters. **RESULTS** UPLC-MS/MS method used in this study was accurate and precise, which met the requirements of biological sample analysis. Compared with DTX-IN group, drug concentration-time curve of DTX-LP was smoother, the blood concentration at each time point was lower, and c_{max} , $t_{1/2}$, $AUC_{0-480\text{min}}$ and $AUC_{0-\infty}$ were significantly decreased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The drug exposure of DTX-LP in plasma is significantly reduced than DTX-IN, indicating it can be rapidly distributed from systemic circulation to liver target organs.

KEYWORDS docetaxel; liposome; in-situ lung cancer model; pharmacokinetics

多西他赛(docetaxel, DTX)是紫杉烷类化疗药物,也是肺癌常用的化疗药物之一,但其临床治疗效果常受制于体内非选择性分布所带来的副作用^[1-2]。因此,DTX治疗肺癌的关键是提高其在肺部肿瘤组织的浓度,

即选择性地分布于肺部肿瘤,从而有利于发挥DTX的疗效并降低其非靶组织的毒副作用。目前上市的DTX只有静脉注射用溶液剂一个剂型。近年来文献报道了一些DTX新制剂,如纳米粒^[3-5]、纳米脂质体^[6]、pH敏感脂质体^[7]、胶束^[8-9]、微球^[10-11]等,旨在改善溶液剂存在的肿瘤部位靶向性不强、增溶剂用量或药物剂量过高等问题。但这些制剂在提高DTX疗效、稳定性,降低毒副作用,促进工业化生产方面均存在明显的不足,如DTX在

[△] 基金项目 重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJQN202102805)

* 第一作者 副教授,博士。研究方向:药物新剂型与新技术。
E-mail: aywlj@126.com

肿瘤组织的蓄积分布问题、高分子材料的安全性和体内代谢问题等仍尚未解决。因此,开发靶向于肿瘤部位的新型DTX制剂具有重要意义。

本课题组前期采用自主创建的固体分散和水化泡腾技术开发了新型肺靶向DTX脂质体(DTX-LP),将DTX更多地传递至肺部及其肿瘤组织,从而提高抗肺癌效果并降低全身毒副作用,基本上解决了肺靶向DTX-LP的制备工艺难点^[12-13]。但肺靶向DTX-LP和DTX溶液剂的体内药动学行为是否存在差异,尚未见研究。基于此,本文以原位肺癌模型兔为研究对象,采用超高效液相色谱-二级串联质谱(UPLC-MS/MS)法考察耳缘静脉给予DTX-LP和DTX注射液(DTX-IN)后的血浆药动学行为,以期对DTX-LP的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要药品与试剂

DTX-LP由本课题组自制;DTX-IN购自杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司;紫杉醇标准品(纯度99.6%,批号100382-201603)购自中国食品药品检定研究院;戊巴比妥钠(批号20171115)购自国药集团化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS,批号180302)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;硫化钠(Na_2S ,批号20171208)购自重庆博艺化学试剂有限公司;0.9%氯化钠注射液(批号20180216)购自天圣制药集团股份有限公司;注射用头孢拉定(批号171018,规格1 g/瓶)购自华北制药河北华民药业有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯。

1.2 主要仪器

UD150L-30E型数字胃肠机购自日本Shimadzu公司;1290型超高效液相色谱仪、6460型三重四极杆质谱仪均购自美国Agilent公司;PB602-E型电子分析天平购自瑞士Mettler Toledo公司;TGL-16G型台式高速离心机购自上海安亭科学仪器厂;DCY-16S型氮吹仪购自青岛海科仪器有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用新西兰兔为4~5月龄,体重2~3 kg,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号为SCXK-(渝)2017-0001。荷瘤种兔由本实验室自制,即将肿块以外科手术的方式接种于新西兰兔体内。

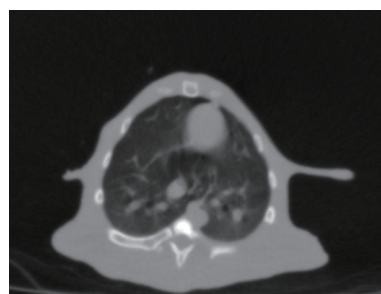
2 方法与结果

2.1 原位肺癌模型兔的构建

采用温热的8% Na_2S 溶液将荷瘤种兔肿瘤接种部位的毛发脱去,以3%戊巴比妥钠溶液(1 mL/kg)经耳缘静

脉注射麻醉,在无菌条件下手术剥离该兔的实体肿瘤组织块,去除周边结缔组织,以0.9%氯化钠注射液冲洗2次,再切取肿瘤边缘部分生长旺盛的鱼肉样组织,制成大小约1 mm³的肿瘤组织块,浸泡于0.9%氯化钠注射液中,备用。取灭菌后的18G穿刺针,拔出针芯,在针管内首先推入一条长约0.5 cm的胶原蛋白海绵条,再取上述1 mm³肿瘤组织块推入针管中部,最后在针管内推入一条长约0.5 cm的胶原蛋白海绵条,使前后的海绵条与肿瘤组织呈“三明治”状,备用。

采用胸腔微创穿刺术复制原位肺癌模型兔。采用温热的8% Na_2S 溶液将兔右胸部毛发脱去,麻醉,仰卧固定于数字胃肠机平板床上,取填装有肿瘤组织块的穿刺针进行体外透视定位,确定穿刺位置和进针角度、深度;按此位置和角度将穿刺针经皮穿刺入右肺,再次透视定位,确定针尖已经刺入右肺,然后推动针芯将肿瘤组织块推入肺部;拔出穿刺针,无菌纱布压迫穿刺点90 s,手术结束。模型兔术后连续3 d肌内注射头孢拉定(0.25 g/d)预防感染,标准饲养,自由饮水。该法平均手术时间约为15 min/只,模型兔于麻醉后2~3 h苏醒,进食、呼吸、活动正常,无气胸导致死亡。造模前后模型兔均进行CT检测,并结合CT结果判断接种是否成功。结果显示,兔接种前肺部未发现任何结节;兔接种2~3周时,CT检测发现右肺内有单发肿瘤结节生长,结节与周围胸壁、膈肌及右心缘不相连,表现为肺内类圆形或不规则形状软组织密度影,边界清楚,病灶内结节密度均匀,具体见图1。



A. 造模前



B. 造模3周后

注:红色箭头所指为肿瘤位置。

图1 原位肺癌模型兔的CT检测结果

2.2 兔血浆中DTX分析方法的建立

2.2.1 色谱与质谱条件

色谱柱为ACQUITY UPLC[®] CSH[™] C₁₈ (3.0 mm×75 mm, 1.7 μm); 流动相为A[甲酸-水(1:1 000, V/V)]-B[甲醇-乙腈(20:80, V/V)], 流动相A、B的体积比为40:60; 流速为0.5 mL/min; 柱温为40 °C; 进样量为10 μL。采用电喷雾离子源(+)在多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下进行检测; 干燥气温度为300 °C, 干燥气流速为5 L/min; 雾化器压力为45 psi; 毛细管电压为4 000 V, 碎片电压为90 V; DTX质荷比(*m/z*)为807.9→526.9, 紫杉醇(内标) *m/z* 为853.8→286.0。DTX和紫杉醇的二级质谱图见图2。

2.2.2 生物样品的处理方法

取模型兔血浆500 μL, 加入100 μL紫杉醇溶液(5 μg/mL)和3 mL蛋白沉淀剂[甲醇-0.03%氨水溶液1(4:1, V/V)], 涡旋5 min后, 15 000 r/min离心10 min; 将上清液倒入活化的固相萃取小柱上, 依次用6 mL超纯水、3 mL甲醇-0.03%氨水溶液2(2:3, V/V)、3 mL甲醇-0.03%氨水溶液3(3:2, V/V)冲洗; 真空抽干小柱后, 以2 mL甲醇重新洗脱, 收集该洗脱液, 于40 °C水浴条件下氮气吹干, 再用200 μL流动相复溶, 经0.22 μm滤头过滤后, 进样检测。

2.2.3 方法学考察

(1) 专属性考察。将空白血浆(处理时不加紫杉

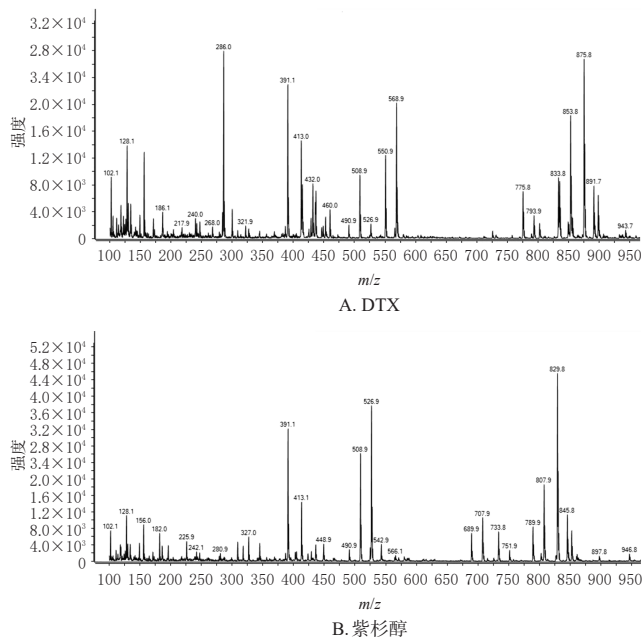


图2 DTX和紫杉醇的二级质谱图

醇)、空白血浆+DTX、给药后30 min的血浆样品, 按“2.2.2”项下方法处理, 按“2.2.1”项下色谱与质谱条件进样分析, 记录质谱图(见图3)。结果显示, 血浆内源性物质不干扰测定。

(2) 标准曲线的绘制。取DTX对照品约100 mg, 精密称定, 用甲醇溶解并定容至100 mL, 再用甲醇稀释成DTX质量浓度分别为0.004 56、0.022 8、0.114、0.570、

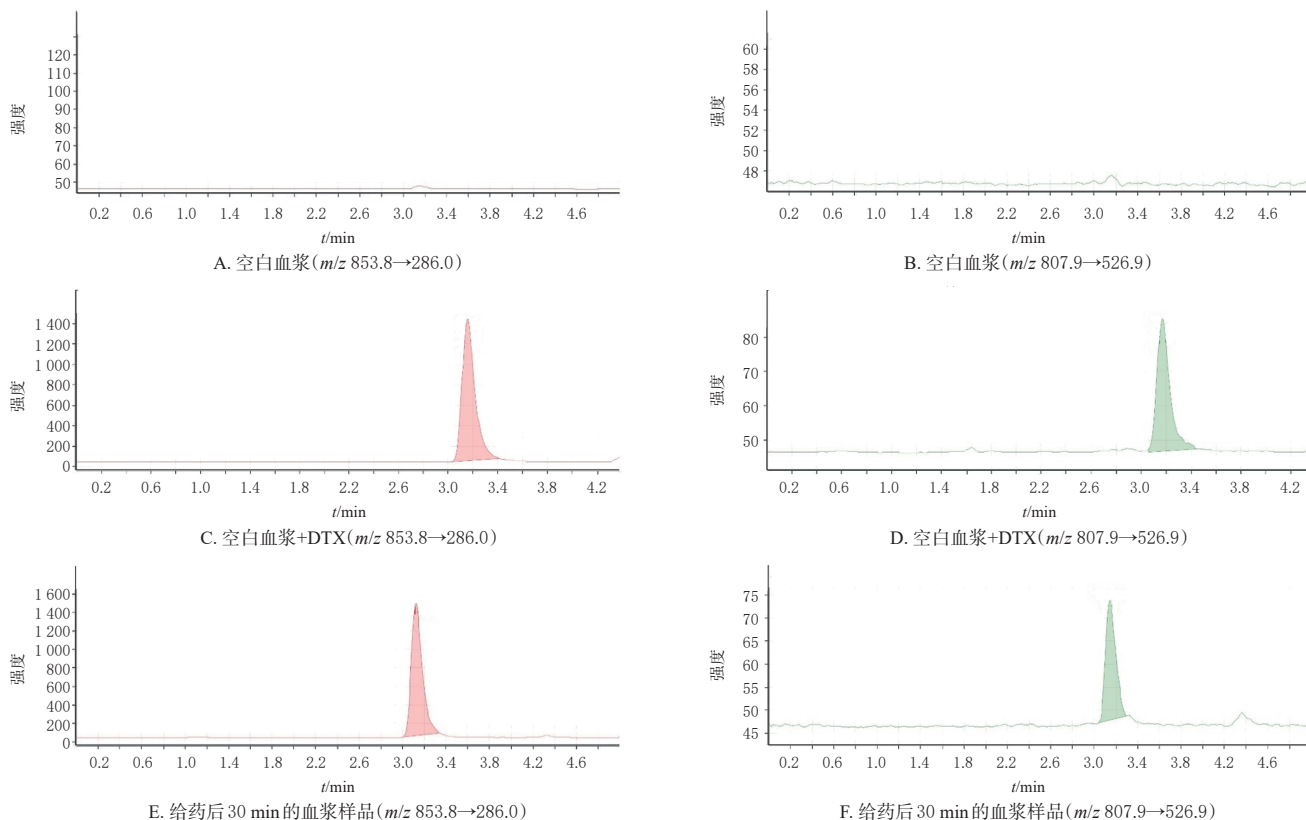


图3 UPLC-MS/MS法的专属性考察结果

1.14、2.85 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,加入空白血浆 500 μL ,配制成系列浓度的标准血浆样品;按“2.2.2”项下方法处理后,再按“2.2.1”项下方法进样分析。以 DTX 峰面积与内标峰面积比值(Y)和药物质量浓度(X)进行线性回归,得标准曲线为 $Y=3.87 \times 10^{-2}X+7 \times 10^{-4}$ ($r=0.9986$),DTX 线性范围为 0.004 56~2.85 $\mu\text{g/mL}$ 。以信噪比 3:1 计算得检测限为 1.0 ng/mL ,以信噪比 10:1 计算得定量限为 4.56 ng/mL 。

(3) 精密度试验。精密量取高、中、低质量浓度 (2.85、0.570、0.004 56 $\mu\text{g/mL}$) 的 DTX 对照品溶液,加入空白血浆 500 μL ,配制成高、中、低质量浓度的 DTX 标准血浆样品,按“2.2.2”项下方法处理后,每天进样 5 次,计算日内精密度;连续进样 5 d,计算日间精密度。结果显示,高、中、低质量浓度的 DTX 的日内精密度 $\text{RSD} \leq 8.96\%$,日间精密度 $\text{RSD} \leq 9.13\%$ ($n=5$)。

(4) 稳定性试验。精密量取高、中、低质量浓度 (2.85、0.570、0.004 56 $\mu\text{g/mL}$) 的 DTX 对照品溶液,加入空白血浆 500 μL ,配制成高、中、低质量浓度的 DTX 标准血浆样品,按“2.2.2”项下方法处理后,于室温放置 8 h 后进样分析,记录峰面积;另同法制备 DTX 标准血浆样品,经 3 次反复冻融后,按“2.2.2”项下方法处理后进样分析,记录峰面积。结果显示,DTX 在血浆中的稳定性较好,室温放置 8 h 和 3 次反复冻融后准确度在 87.49%~102.99%, $\text{RSD} \leq 9.66\%$ 。

(5) 提取回收率试验。精密量取高、中、低质量浓度 (2.85、0.570、0.004 56 $\mu\text{g/mL}$) 的 DTX 对照品溶液,加入空白血浆 500 μL ,按“2.2.2”项下方法处理后,再按“2.2.1”项下方法进样分析,峰面积记为 A_1 ;另取空白血浆 500 μL (不加 DTX),按“2.2.2”项下方法处理,向获得的甲醇洗脱液中加入相同体积的高、中、低质量浓度 (2.85、0.570、0.004 56 $\mu\text{g/mL}$) 的 DTX 对照品溶液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以氮气挥干溶剂,复溶,过滤,进样,峰面积记为 A_2 。以 A_1 和 A_2 的比值计算提取回收率;内标同法处理。结果显示,高、中、低质量浓度 DTX 的提取回收率分别为 (82.76 \pm 3.18)%、(87.44 \pm 6.74)%、(66.67 \pm 5.77)%,内标的提取回收率为 (86.64 \pm 7.58)%。

(6) 基质效应。取空白血浆按“2.2.2”项下方法处理后,加入 DTX 和内标,制成高、中、低质量浓度 (2.85、0.570、0.004 56 $\mu\text{g/mL}$) 的 DTX 溶液,进样分析,测定 DTX 与内标峰面积的比值(A);另用流动相配制上述 3 种质量浓度的溶液,进样分析,测定 DTX 与内标峰面积的比值(B);计算基质效应 (基质效应 = $A/B \times 100\%$)。结果显示,基质效应 $\geq 93.7\%$ 。

2.3 药动学实验

选取造模成功的原位肺癌模型兔 6 只,随机分为 DTX-IN 组和 DTX-LP 组,每组 3 只。两组兔均耳缘静脉注射给予 DTX-IN 和 DTX-LP,给药剂量均为 1.0 mg/kg (以 DTX 计),剂量根据人和兔体表面积折算而得。给药后,分别于 5、15、30、60、90、120、240、480 min 时,在给药对侧耳缘静脉取血 2 mL,以 15 000 r/min 离心 10 min,取上层血浆于 -80°C 条件下保存。测定时,将样品解冻后按“2.2.2”项下方法处理,再按“2.2.1”项下条件进样分析,计算不同时间下兔血浆中 DTX 浓度,并绘制药-时曲线。采用 DAS 3.3 软件对兔血浆中 DTX 浓度进行拟合与分析,计算主要药动学参数 (t_{max} 、 C_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 $\text{AUC}_{0 \rightarrow 480 \text{ min}}$ 、 $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$)。采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,药动学数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

由图 4 可知,DTX-LP 组的药-时曲线趋势较平缓,各时间点的血药浓度均低于 DTX-IN 组,两种制剂的药动学行为也均符合三室模型,这提示 DTX-LP 在模型兔血浆中的总量比 DTX-IN 组低,同时药物消除速度较慢,这可能是由 DTX-LP 的肺靶向作用引起的。由表 1 可知,与 DTX-IN 组比较,DTX-LP 组的 C_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 $\text{AUC}_{0 \rightarrow 480 \text{ min}}$ 、 $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ 均显著降低 ($P < 0.05$)。

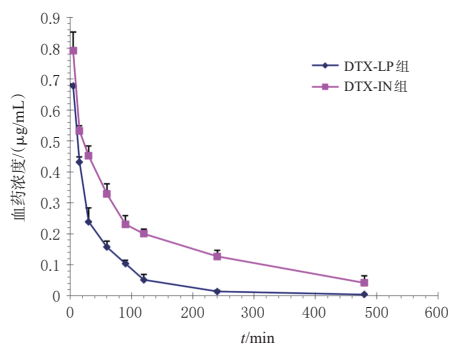


图 4 静脉注射 DTX-LP 和 DTX-IN 后在模型兔体内的药-时曲线 ($n=3$)

表 1 DTX-LP 和 DTX-IN 在模型兔血浆中的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

参数	DTX-LP 组	DTX-IN 组
$C_{\text{max}}/(\mu\text{g/mL})$	0.68 \pm 0.01 ^a	0.79 \pm 0.06
$t_{\text{max}}/\text{min}$	5.00	5.00
$t_{1/2}/\text{min}$	77.88 \pm 17.56 ^a	177.01 \pm 38.99
$\text{AUC}_{0 \rightarrow 480 \text{ min}}/(\mu\text{g} \cdot \text{h/mL})$	30.61 \pm 2.70 ^a	82.51 \pm 5.72
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{h/mL})$	30.87 \pm 2.58 ^a	95.33 \pm 8.14

a: 与 DTX-IN 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

DTX-IN 给药后体内分布广泛、缺乏靶向性,不能有效地到达靶组织,且较大的使用剂量容易带来一系列毒副作用,如中性粒细胞减少、液体滞留、神经病变、骨髓

抑制、神经毒性、肝毒性、肾毒性等,从而影响DTX-IN在临床上的使用^[14]。因此,提高DTX在肿瘤组织的浓度,对提高疗效、降低毒副作用具有重要意义^[15]。

前期研究已经证实,模型兔给予DTX-LP和DTX-IN 0.5、1.5、4、8、12 h后,DTX-LP组模型兔肺组织中DTX的浓度分别为DTX-IN组的12.1、10.2、7.5、3.3、7.2倍^[6]。由于DTX-LP明显地改变了DTX-IN在兔体内的组织分布行为,因此需要从药动学角度比较两者之间的差异,进一步明确DTX-LP的体内变化全过程,为其在临床上的安全使用奠定基础。本文结果证实,与DTX-IN组比较,DTX-LP组模型兔在各时间点的血药浓度更低,这是由于DTX-LP将更多的药物分布在肺部 and 肿瘤组织中,使血浆中的药物减少。DTX-LP组 $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow 480 \text{ min}}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 降低,提示该制剂能快速从体循环中分布到肺靶器官,使得血浆中药物的分布降低,由此推测,该制剂在产生肺靶向效果的同时,也可降低全身毒性。

综上所述,DTX-LP在血浆中的暴露量较DTX-IN降低,提示该制剂能快速地从体循环中分布到靶器官,达到了提高疗效而降低毒副作用的目的,是一种具有临床应用前景的靶向制剂。

参考文献

[1] SEMB K A, AAMDAL S, OIAN P. Capillary protein leak syndrome appears to explain fluid retention in cancer patients who receive docetaxel treatment[J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(10):3426-3432.

[2] BÉHAR A, PUJADE-LAURAIN E, MAUREL A, et al. The pathophysiological mechanism of fluid retention in advanced cancer patients treated with docetaxel, but not receiving corticosteroid comedication[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1997, 43(6):653-658.

[3] PETROV R A, MEFEDOVA S R, YAMANSAROV E Y, et al. New small-molecule glycoconjugates of docetaxel and GalNAc for targeted delivery to hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Pharm*, 2021, 18(1):461-468.

[4] LIU M R, KHAN A R, JI J B, et al. Crosslinked self-assembled nanoparticles for chemo-sonodynamic combination therapy favoring antitumor, antimetastasis management and immune responses[J]. *J Control Release*, 2018, 290:150-164.

[5] DU Y Q, TIAN C T, WANG M L, et al. Dipeptide-modified nanoparticles to facilitate oral docetaxel delivery: new insights into PepT1-mediated targeting strategy[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1):1403-1413.

[6] YADAV D K, PAWAR H, WANKHADE S, et al. Development of novel docetaxel phospholipid nanoparticles for intravenous administration: quality by design approach[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2015, 16(4):855-864.

[7] GU Z L, DA SILVA C G, HAO Y, et al. Effective combination of liposome-targeted chemotherapy and PD-L1 blockade of murine colon cancer[J]. *J Control Release*, 2023, 353:490-506.

[8] BRAAL C L, BRUIJN P D, ATRAFI F, et al. A new method for the determination of total and released docetaxel from docetaxel-entrapped core-crosslinked polymeric micelles (CriPec®) by LC-MS/MS and its clinical application in plasma and tissues in patients with various tumours[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 161:168-174.

[9] ZHU Y Q, JIANG Y, MENG F H, et al. Highly efficacious and specific anti-glioma chemotherapy by tandem nanomicelles co-functionalized with brain tumor-targeting and cell-penetrating peptides[J]. *J Control Release*, 2018, 278:1-8.

[10] SONG C, GAO C, ZHAO J, et al. Construction of long-circulation EpCAM targeted drug delivery system and its application in the diagnosis and treatment of breast cancer[J]. *J Biomater Appl*, 2021, 35(8):947-957.

[11] PALIASHVILI K, POPOV A, KALBER T L, et al. Peritumoral delivery of docetaxel-TIPS microparticles for prostate cancer adjuvant therapy[J]. *Adv Ther*, 2021, 4(2):2000179.

[12] 余瑜, 赵领, 李伟, 等. 注射用肺靶向载药前体脂质体及其使用方法:CN101474155A[P]. 2009-07-08.

[13] 余瑜, 李伟, 刘宇, 等. 注射用肺靶向载药前体脂质体及其使用方法:CN200910103135.X [P]. 2009-07-08.

[14] RAROKAR N R, SAOJI S D, RAUT N A, et al. Nanostructured cubosomes in a thermoresponsive depot system: an alternative approach for the controlled delivery of docetaxel[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17(2):436-445.

[15] WANG L J, LI R, CHE K K, et al. Enhanced antitumor effect on intrapulmonary tumors of docetaxel lung-targeted liposomes in a rabbit model of VX2 orthotopic lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10069.

[16] YANG J, LI X G, LI W J, et al. An improved LC-MS/MS method for determination of docetaxel and its application to population pharmacokinetic study in Chinese cancer patients[J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(8):e4857.

(收稿日期:2023-01-15 修回日期:2023-06-10)

(编辑:唐晓莲)