

环孢素A纳米粒滴眼液制备及眼的刺激性**

张海娟¹, 徐清², 马科¹, 吴雁², 游玉霞¹

¹首都医科大学附属北京同仁医院, 北京同仁眼科中心, 北京市眼科研究所, 北京市100005; ²国家纳米科学中心, 北京市100190

张海娟★, 女, 1965年生, 河北省承德市人, 汉族, 1998年中国协和医科大学毕业, 硕士, 副研究员, 主要从事药物开发研究。
zhanghaijuan1965@yahoo.cn

通讯作者: 吴雁。副研究员, 国家纳米科学中心, 北京市100190
wuy@nanoctr.cn

通讯作者: 马科, 副主任医师, 首都医科大学附属北京同仁医院, 北京同仁眼科中心, 北京市眼科研究所, 北京市100005
cdmake@sohu.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)43-08018-05

收稿日期: 2012-01-19
修回日期: 2012-03-15
(20111208019/GW T)

文章亮点: 制备具有水溶性的环孢素A纳米粒滴眼液, 发现单次、多次给药期间, 家兔双眼结膜、角膜、虹膜的眼刺激性反应分值和综合评分均为0, 说明其对眼无刺激性。

关键词: 环孢素A; 纳米粒滴眼液; 制备; 眼刺激性; 角膜; 兔; 纳米粒子; 结膜; 虹膜; 生物材料

摘要

背景: 环孢素A可有效抑制角膜移植后的免疫排斥反应, 但因难溶于水, 不能配制成水溶性制剂用于眼局部。

目的: 制备1%环孢素A纳米粒滴眼液, 并观察其眼刺激性。

方法: 采用聚乙二醇-聚乳酸共聚物对环孢素A药物进行包裹, 制备浓度为1%的环孢素A纳米粒滴眼液, 以透射电镜、激光粒度仪对制备的纳米粒子进行表征; 通过家兔单次、多次给药眼刺激性实验观察环孢素A纳米粒滴眼液的眼刺激性。

结果与结论: 环孢素A纳米粒滴眼液包封率为85.10%, 载药量为21.3%; 纳米粒子为球形粒子, 分散均匀; 载药纳米粒子粒径分布较窄, 粒径大小为(296.9±32.06) nm; 体外释放曲线显示, 环孢素A从纳米粒子中缓慢释放, 20 d左右释放量达总环孢素的91.3%。环孢素A纳米粒滴眼液单次、多次给药期间, 家兔双眼结膜、角膜、虹膜的眼刺激性反应分值和综合评分均为0, 说明其对眼无刺激性。

Preparation of cyclosporine A nano-particle eye drops and its irritation to the eyes

Zhang Hai-juan¹, Xu Qing², Ma Ke¹, Wu Yan², You Yu-xia¹

Abstract

BACKGROUND: Cyclosporine A can inhibit the immunological rejection after corneal transplantation. But it cannot be formulated into ophthalmic solution for its insolubility.

OBJECTIVE: To prepare 1% cyclosporine A nano-particle eye drops and to investigate its irritation to the eyes.

METHODS: Cyclosporine A was successfully incorporated into poly (ethylene glycol)-poly (dl-lactide) (PEG-PLA), and 1% cyclosporine A nano-particle eye drops were prepared. The nano-particle eye drop was characterized by using transmission electron microscopy and dynamic light scattering. The irritation of cyclosporine A nano-particle eye drops was observed through single and multiple irritative tests to the eyes in rabbits.

RESULTS AND CONCLUSION: Drug-loading and encapsulation efficiency of cyclosporine A nano-particle eye drops were 21.3% and 85.10%, respectively. The cyclosporine A nano-particles showed sphericity with even dispersion. The average size of cyclosporine A-loaded nano-particle was (296.9±32.06) nm with narrow distribution. Drug release curve *in vitro* exhibited a sustained drug release of cyclosporine A from the nano-particles. The release amount was 91.3% of cyclosporine A around 20 days. The irritation scores on the conjunctiva, cornea and iris were zero at the period of single and multiple administrations, indicating no irritation was found. These findings suggest that the cyclosporine A nano-particle has no irritation to the eyes.

Zhang HJ, Xu Q, Ma K, Wu Y, You YX. Preparation of cyclosporine A nano-particle eye drops and its irritation to the eyes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(43): 8018-8022.

0 引言

角膜移植后的排斥反应是手术失败的主要原因, 寻找高效低毒的角膜移植后排斥反应抑制剂是眼科工作者努力的方向。环孢素A作为一种强效免疫抑制剂, 可有效抑制角膜移植后的免疫排斥反应^[1], 但因难溶于水, 不能配制成水溶性制剂用于眼局部。本实验选用生物相容和生物可降解纳米材料, 利用纳米技术进行连接, 制备具有水溶性的环孢素A纳米粒滴眼液, 并对其理化特征、眼刺激性进行研究, 为临床应用提供依据^[2-5]。

1 材料和方法

设计: 材料制备及动物实验。

时间及地点: 于2010年1月至2011年12月在国家纳米科学中心、首都医科大学动物室完成。

材料:

实验动物: 新西兰家兔10只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 平均体质量2.17 kg, 雌雄兼用, 外眼检查正常。

试剂:

试剂	来源
环孢素 A	上海沪宇生物科技有限公司
聚乙二醇-聚(乳酸-羟基乙酸), 乳酸/羟基乙酸 50 : 50, 相对分子质量 50 000	济南岱罡生物工程技术有限公司
聚乙烯醇	国药集团化学试剂有限公司
二氯甲烷	北京化工厂
乙腈	默克公司
透析袋	北京京科宏达生物技术有限公司, M_wCO 3 500Da

实验方法:

环孢素A纳米粒滴眼液的制备^[6-7]: 采用乳化溶剂挥发法制备环孢素A纳米粒滴眼液。具体步骤如下: 将200 mg聚乙二醇-聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物溶于4 mL二氯甲烷中, 另取50 mg环孢素A溶于2 mL二氯甲烷/丙酮(1 : 1)混合溶液中, 将共聚物和环孢素A溶液两者混合, 滴加到含30 mL 1%聚乙烯醇溶液中, 常温下磁力搅

拌。10 min后, 用超声细胞粉碎机在50 W功率下超声5 min, 即得乳液(O/W)。减压蒸馏除去二氯甲烷, 8 000 r/min离心10 min得载药纳米粒子, 用去离子水中洗2遍, 所得纳米粒子用磷酸缓冲溶液溶解, 配制成浓度为1%的环孢素A纳米粒滴眼液, 4 °C保存。

环孢素A纳米粒滴眼液的表征: 采用美国FEI公司的型号为TecnaiG² 20 S-TWIN的透射电镜对环孢素A纳米粒滴眼液形态进行观察, 透射电镜测试加速电压为200 kV。样品制备采用负染色法, 用液滴法将环孢素A纳米粒滴眼液滴加在表面附着碳支持膜的铜网上, 干燥24 h后, 滴加负染色剂醋酸双氧铀进行染色, 样品在真空干燥箱中干燥后进行电镜测试。

采用英国Malvern Instruments公司的型号为Zetasizer Nano series ZEN 3600激光粒度仪测定环孢素A纳米粒滴眼液的水合直径及粒径分布。将样品溶液置于1 cm的塑胶样品池中进行测定, 条件设定: $\lambda=633$ nm, 测定角度90°, 温度25 °C。

环孢素A纳米粒滴眼液包封率和载药量的测定^[8]: 通过测定环孢素A纳米粒滴眼液中环孢素A的含量来计算包封率和载药量。将制备的环孢素A纳米粒滴眼液, 经真空冷冻干燥后, 溶于乙腈, 用高效液相色谱测定环孢素A含量。色谱条件: 高效液相色谱仪(Waters, 600E, 2478), C18 (Waters, Nova-Pak 3.9×250 mm), 柱温30 °C; 流动相: 乙腈 : 水=70 : 30; 进样量为10 μ L; 流速为1 mL/min; 检测波长210 nm。每个样品都重复做3次, 测量取平均值。包封率和载药量计算公式如下:

$$\text{包封率(\%)} = \frac{\text{纳米粒子中的环孢素 A 质量}}{\text{初始环孢素 A 质量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量(\%)} = \frac{\text{纳米粒子中的环孢素 A 质量}}{\text{冷冻干燥后纳米粒子总质量}} \times 100\%$$

环孢素A纳米粒滴眼液的体外释放曲线^[9]: 精确称取冷冻干燥后载药纳米粒子10 mg, 置于透析袋内, 用3 mL PBS分散载药纳米粒子。将密封好的透析袋置于35 mL PBS中, 放入水浴振荡器中进行释放实验, 保持温度为37 °C, 振荡速度为110 r/min。每隔一段时间, 取0.5 mL释放液供分析检测, 并补充0.5 mL新鲜的PBS, 即置换量为0.5 mL。用高效液相色谱检测取出的释放液

¹Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China; ²National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100005, China

Zhang Hai-juan★, Master, Associate researcher, Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China zhanghaijuan1965@yahoo.cn

Corresponding author: Wu Yan, Associate researcher, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100005, China wuy@nanoctr.cn

Corresponding author: Ma Ke, Associate chief physician, Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China cdmake@sohu.com

Supported by: Science and Technology Planning Subject Program of Beijing, No. Z09050700620908*

Received: 2012-01-19
Accepted: 2012-03-15

中的环孢素A含量,再计算累计释放量,计算公式如下:

$$E_r = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{drug}}$$

式中: E_r 为环孢素A累计释放量(%); V_e 为PBS的置换体积(0.5 mL); V_0 为释放液PBS的体积(30 mL); C_i 为第*i*次置换取样时释放液的质量浓度(g/L); m_{drug} 为用于释放的载药纳米粒子中环孢素A的质量(mg); n 为置换PBS的次数。重复实验3次,测量结果取平均值。

环孢素A纳米粒滴眼液的眼刺激性实验:取新西兰家兔,右眼滴1%环孢素A纳米粒滴眼液,左眼滴生理盐水,单次给药眼刺激性实验为每只家兔结膜囊内滴药1次,共2滴;多次给药眼刺激性实验为每只家兔每日结膜囊内滴药3次,连续14 d。

实验方法:手电筒、裂隙灯显微镜下检查家兔外眼后,采用自体自身对照,右眼为实验眼,滴入1%环孢素A纳米粒滴眼液,左眼为对照眼,滴生理盐水,双眼被动闭合10 s。由二三人组成观察小组,采用双盲法用手电筒、裂隙灯显微镜观察,单次给药眼刺激性实验观察记录滴眼后6, 24, 48, 72 h至7 d眼局部反应情况,多次给药眼刺激性实验观察记录用药期间及停药后7 d眼局部反应情况,并观察记录动物皮毛、呼吸、中枢神经系统、四肢活动等其他中毒表现。

采用眼刺激反应评分标准对结膜、角膜、虹膜分别评分^[10],并分别相加,算出总积分,除以动物数,得出最后分数,按眼刺激性评价标准判断受试药物对眼结膜、角膜、虹膜的刺激程度^[10]。

2 结果

2.1 环孢素A纳米粒滴眼液纳米粒子形态 环孢素A纳米粒滴眼液纳米粒子形态学特征由透射电子显微镜分析,见图1。

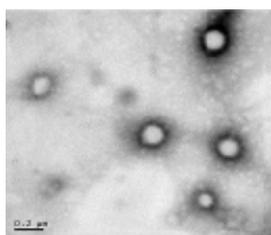
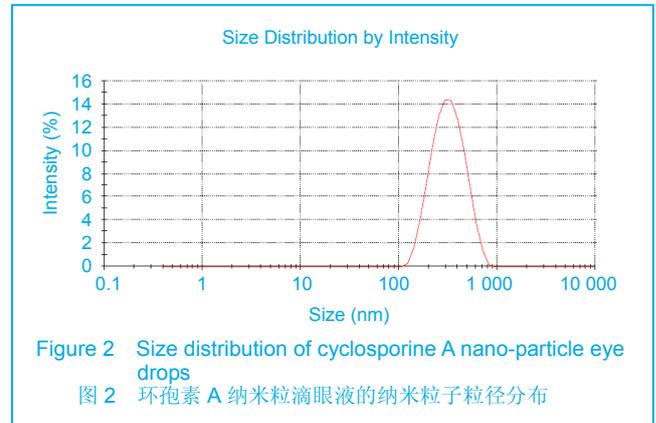


Figure 1 Transmission electron microscopy image of cyclosporine A nano-particle eye drops
 图1 环孢素A纳米粒滴眼液的透射电镜图

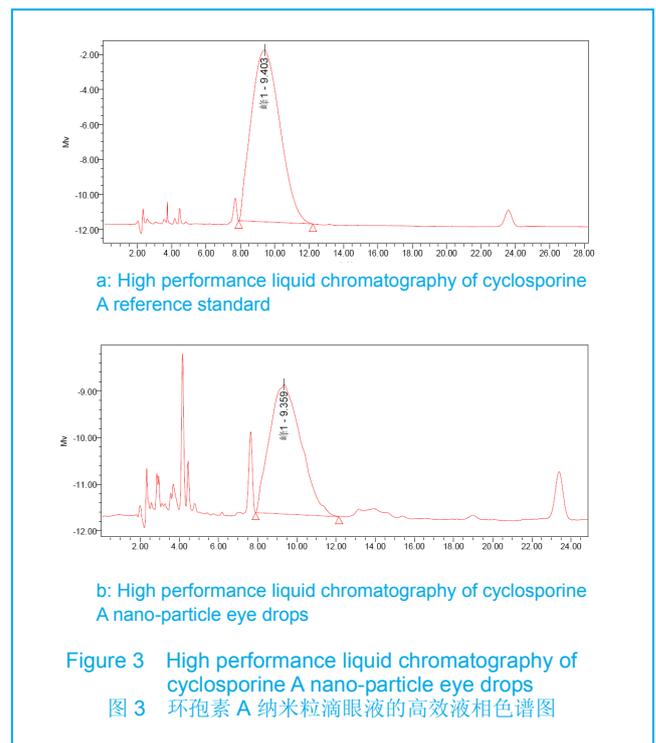
由图1可以看出载药纳米粒子呈球形,分散均匀,且无团聚现象,粒径在200 nm左右。

2.2 环孢素A纳米粒滴眼液的纳米粒子粒径与分布 环孢素A纳米粒滴眼液纳米粒子粒径及分布由激光粒度仪测定,见图2。



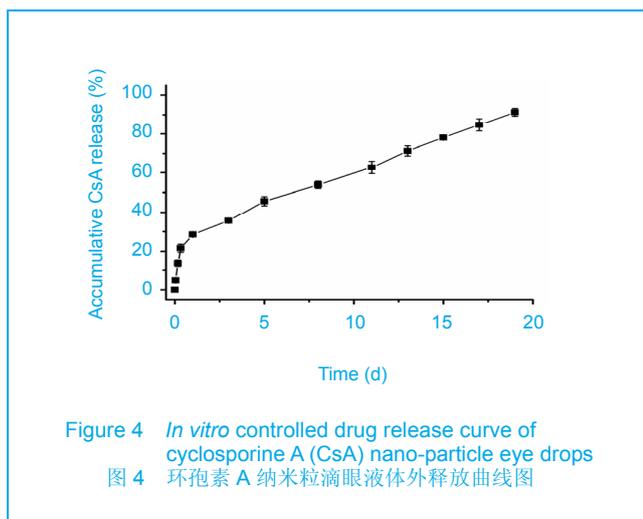
由图2可得出载药纳米粒子粒径分布较窄,分散系数PDI为0.108,粒径大小为(296.9±32.06) nm。透射电镜所观察到的纳米粒子粒径小于激光粒度仪所测得的结果,这是因为激光粒度仪测试的是分散在水溶液中的纳米粒子水合直径,而透射电镜观察是处于干燥状态,所以粒径小。

2.3 环孢素A纳米粒滴眼液纳米粒子包封率和载药量 环孢素A纳米粒滴眼液中环孢素A的含量用高效液相色谱来测定,见图3。



由环孢素A标准品的高效液相色谱图3a可知9.0-10.0 min处的特征吸收峰为环孢素A药物的最大吸收峰;环孢素A纳米粒滴眼液的高效液相色谱图3b中可见在9.0-10.0 min附近出现了环孢素A的特征吸收峰,说明环孢素A被成功地包裹进纳米粒子中。根据公式计算,用乳化溶剂挥发法制备环孢素A纳米粒滴眼液的封装率为85.1%,载药量为21.3%。

2.4 环孢素A纳米粒滴眼液的体外释放曲线 环孢素A从纳米粒子中的释放曲线见图4。

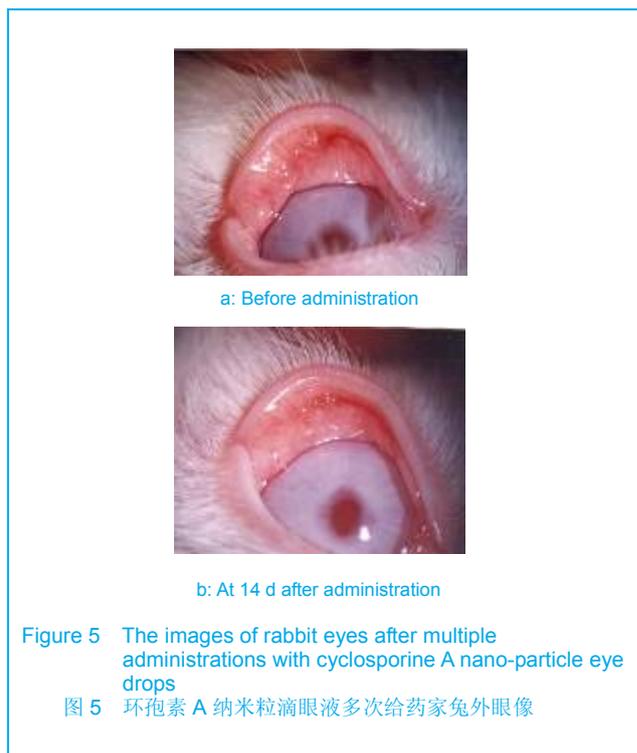


由图4可看出,最初一段时间环孢素A纳米粒滴眼液有药物突释现象,随后药物缓慢稳步释放,20 d左右释放量达总环孢素A的91.3%。通过乳化溶剂挥发法制备环孢素A纳米粒滴眼液时,聚合物在水中形成纳米粒子过程中,被包载的药物一部分分布在纳米粒子外壳,形成表面药物层,因此载药纳米粒子具有一定的突释现象。

2.5 眼刺激性实验结果 滴用环孢素A纳米粒滴眼液后,在整个观察期间,家兔皮毛光泽,行为活动、摄食及粪便正常,未出现家兔死亡及急性毒性反应。

在单次给药眼刺激性实验中,环孢素A纳米粒滴眼液结膜囊内给药后6, 24, 48, 72 h至7 d观察,家兔眼结膜无充血、水肿、分泌物,角膜无混浊、水肿,荧光素染色无着色,虹膜无充血、水肿,瞳孔正大等圆,眼刺激性反应的分值和综合评分均为0,与生理盐水对照组相同,说明环孢素A纳米粒滴眼液对眼均无刺激性。

环孢素A纳米粒滴眼液多次给药眼刺激性实验,观察给药后6, 24, 48, 72 h至14 d及停药后7 d家兔双眼结膜、角膜、虹膜的反应分值和综合评分均为0,与单次给药实验结果相同,环孢素A纳米粒滴眼液对眼无刺激,见图5。



3 讨论

研究制备难溶性药物纳米制剂是目前解决难溶性药物生物利用度低、吸收差的有效手段^[11-17]。本实验采用的纳米材料聚乙二醇-聚乳酸共聚物,具有良好的生物相容性和生物可降解性,可增强穿透作用,因此被研制成为生物大分子药物的运送载体,以增强药物在体内的有效浓度,提高疗效。而与其他种类的高分子药物载体相比,聚乙二醇-聚乳酸共聚物不仅原料丰富,而且具有低成本,可生物降解,良好生物相容性和生物亲和性、无毒、易于化学改性等优点。

本实验采用乳化溶剂蒸发法制备的环孢素A纳米粒滴眼液,可直接用聚乙二醇-聚乳酸共聚物作为环孢素A药物的载体,避免了繁琐和复杂的修饰步骤,操作过程方便,并降低了生产成本,利于推广。

本实验制备的环孢素A纳米粒滴眼液,纳米粒子为规则球体,分散性好,粒径控制在200 nm左右,无团聚现象,可明显提高环孢素A的水溶性,解决了疏水药物环孢素A制备成水溶液的问题。

目前临床使用的环孢素A滴眼液为油性制剂,具有包括刺激、视力模糊、角膜毒性等的局部副作用^[18],本实验眼刺激性实验表明,1%环孢素A纳米粒滴眼液对眼无刺激性。前期药代动力学研究结果表明,该制剂可延长药物作用持续时间,提高生物利用度;前期药效学结

果表明, 环孢素A纳米粒滴眼液在0.5%–2%浓度范围内, 均能有效抑制角膜移植后的排斥反应, 而且随着药物浓度的增加, 抗角膜排斥作用逐渐增强。上述研究结果, 为新型环孢素A纳米粒滴眼液的进一步开发奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Sinha R, Jhanji V, Verma K, et al. Efficacy of topical cyclosporine A 2% in prevention of graft rejection in high-risk keratoplasty: a randomized controlled trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010;248(8):1167-1172.
- [2] Xiong XB, Falamarzian A, Garg SM, et al. Engineering of amphiphilic block copolymers for polymeric micellar drug and gene delivery. *J Control Release*. 2011;155(2):248-261.
- [3] Li T, Longobardi L, Granero-Molto F, et al. Use of glycol chitosan modified by 5 β -cholanic acid nanoparticles for the sustained release of proteins during murine embryonic limb skeletogenesis. *J Control Release*. 2010;144:101-108.
- [4] Wu W, Shen J, Banerjee P, et al. Water-dispersible multifunctional hybrid nanogels for combined curcumin and photothermal therapy. *Biomaterials*. 2011;32(2):598-609. Shen Y, Jin E, Zhang B, et al. Prodrugs forming high drug loading multifunctional nanocapsules for intracellular cancer drug delivery. *J Am Chem Soc*. 2010;132(12):4259-4265.
- [5] Aliabadi HM, Mahmud A, Sharifabadi AD, et al. Micelles of methoxy poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of cyclosporine A. *J Control Release*. 2005;104(2):301-311.
- [6] Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release*. 2004;99(2):271-280.
- [7] Wu W, Tang XL, He MF. *Guangdong Yaoxue*. 2003;13(4):21-22.
吴伟,唐细兰,何梅凤. 高效液相色谱法测定环孢素A滴眼液含量[J]. *广东药学*, 2003, 13(4):21-22.
- [8] Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, et al. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Control Release*. 2002;79:123-135.
- [9] Hu TH, Mao YC, Sun JY. *Jiangxi: Jiangxi Chubanshe*. 2000:112. 胡崇洪,毛友昌,孙继寅. *中药新药研制学*[M]. 江西:江西科学出版, 2000:112.
- [10] Yang ZQ, Pan P, Xu J, et al. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*. 2008;43(23):1798-1803.
杨志强,潘萍,许洁,等. 环孢素A-Eudragit S100纳米粒的制备及其体内外评价[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(23):1798-1803.
- [11] Xiong XB, Uludağ H, Lavasanifar A. Biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polyesters with grafted polyamines as supramolecular nanocarriers for efficient siRNA delivery. *Biomaterials*. 2009;30(2):242-253.
- [12] Wang H, Zhao Y, Wu Y, et al. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(32):8281-8290.
- [13] Ebrahimnejad P, Dinarvand R, Sajadi A, et al. Preparation and in vitro evaluation of actively targetable nanoparticles for SN-38 delivery against HT-29 cell lines. *Nanomedicine*. 2010;6(3):478-485.
- [14] Cao Z, Yu Q, Xue H, et al. Nanoparticles for Drug Delivery Prepared from Amphiphilic PLGA Zwitterionic Block Copolymers with Sharp Contrast in Polarity between Two Blocks. *Angew Chem Int Ed*. 2010;49(22):3771-3776.
- [15] Gupta H, Aqil M, Khar RK, et al. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine*. 2010;6:324-333.
- [16] Akhlaghi SP, Saremi S, Ostad SN, et al. Discriminated effects of thiolated chitosan-coated pMMA paclitaxel-loaded nanoparticles on different normal and cancer cell lines. *Nanomedicine*. 2010;6(5):689-697.
- [17] Campos AM, Sanchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Inter J Pharm*. 2001;224:159-168.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 北京市科技计划课题资助项目 (Z09050700620908)。

作者贡献: 张海娟、吴雁进行实验设计, 实验实施为张海娟、徐清、马科、游玉霞, 张海娟、徐清成文, 吴雁审校, 张海娟、吴雁对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章概要:

文章要点: 制备 1%环孢素 A 纳米粒滴眼液, 并观察其眼刺激性。

关键信息: 环孢素 A 可有效抑制角膜移植后的免疫排斥反应, 但因难溶于水, 不能配制成水溶性制剂用于眼局部。

研究的创新之处与不足: 发现环孢素 A 纳米粒滴眼液单次、多次给药对家兔双眼结膜、角膜、虹膜无刺激性。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。