

# 贝伐单抗多囊脂质体的处方优化及体外释放特性研究<sup>Δ</sup>

王毅云<sup>1\*</sup>, 慕宏杰<sup>1</sup>, 华红臣<sup>1</sup>, 姜莹<sup>1</sup>, 孟庆庆<sup>1</sup>, 王爱萍<sup>1,2</sup>, 刘沙<sup>1</sup>, 孙考祥<sup>1,2#</sup>(1.烟台大学药学院, 山东烟台 264005; 2.山东绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室, 山东烟台 264003)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0922-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.14

**摘要** 目的:制备具有缓释作用的贝伐单抗(BEV)多囊脂质体(BEV-MVLs),并对其体外释放特性进行研究。方法:采用复乳法制备BEV-MVLs,以有机相中三油酸甘油酯(TO)的浓度、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)-胆固醇(CH)的比值(mol/mol)、外水相中L-赖氨酸的浓度为因素,以包封率为指标,采用Box-Behnken设计-响应面法对方剂进行优化。采用倒置荧光显微镜和扫描电镜观察BEV-MVLs的形态,激光粒度仪测定其粒径,高效液相色谱法测定BEV含量并计算其包封率和体外累积释放度。结果:最优处方为有机相中TO 2.72 mmol/L、DOPC-CH比值0.67(mol/mol)、外水相中L-赖氨酸40 mmol/L。所制BEV-MVLs的包封率为(80.65±4.42)%( $n=3$ ),与预测值的相对误差为2.54%;脂质体外观呈球形,大小较均匀,为典型的非同心囊泡结构,平均粒径为16.80 μm;30 d的体外累积释放度约为92%。结论:成功制得具有缓释作用的BEV-MVLs,其包封率达到预期效果。

**关键词** 贝伐单抗;多囊脂质体;复乳法;Box-Behnken设计-响应面法;处方优化;体外释放

## Study on Formulation Optimization and *in vitro* Release Characteristics of Bevacizumab Multivesicular Liposomes

WANG Yiyun<sup>1</sup>, MU Hongjie<sup>1</sup>, HUA Hongchen<sup>1</sup>, JIANG Ying<sup>1</sup>, MENG Qingqing<sup>1</sup>, WANG Aiping<sup>1,2</sup>, LIU Sha<sup>1</sup>, SUN Kaoxiang<sup>1,2</sup>(1.School of Pharmacy, Yantai University, Shandong Yantai 264005, China; 2.State Key Lab

模型小鼠体内也发现姜黄素能通过下调miR-21而发挥抑制肿瘤生长的抗肿瘤作用。本研究结果从表观遗传学调控方面证实了姜黄素可通过下调促癌基因miR-21的表达,上调PDCD4蛋白表达发挥抗骨肉瘤作用,这为证明姜黄素在骨肉瘤中的抗癌机制提供了实验依据。

### 参考文献

- [1] 张英,李冬梅,邢颖.姜黄素的药理作用与载体研究进展[J].中国药房,2015,26(13):1850-1852.
- [2] KUNNUMAKKARA AB, BORDOLOI D, PADMAVATHI G, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(11):1325-1348.
- [3] PANDA AK, CHAKRABORTY D, SARKAR I, et al. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin[J]. *J Exp Pharmacol*, 2017. DOI: 10.2147/JEP.S70568.
- [4] SCHICKEL R, BOYERINAS B, PARK SM, et al. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death[J]. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5959-5974.
- [5] WANG Z, YAO W, LI K, et al. Reduction of miR-21 induces SK-N-SH cell apoptosis and inhibits proliferation

via PTEN/PDCD4[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4727-4733.

- [6] HUANG JH, CAO Y, ZENG L, et al. Tetramethylpyrazine enhances functional recovery after contusion spinal cord injury by modulation of MicroRNA-21, FasL, PDCD4 and PTEN expression[J]. *Brain Res*, 2016, 1648(Pt A): 35-45.
- [7] ZHANG X, NG WL, WANG P, et al. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNF $\alpha$ [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(18): 4707-4713.
- [8] HASHIMI ST, FULCHER JA, CHANG MH, et al. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation[J]. *Blood*, 2009, 114(2): 404-414.
- [9] HUA Y, JIN Z, ZHOU F, et al. The expression significance of serum MiR-21 in patients with osteosarcoma and its relationship with chemosensitivity[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(13): 2989-2994.
- [10] ISAKOFF MS, BIELACK SS, MELTZER P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 3029-3035.
- [11] QADIR MI, NAQVI ST, MUHAMMAD SA. Curcumin: a polyphenol with molecular targets for cancer control[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(6): 2735-2739.

<sup>Δ</sup> 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2016HB58)

\* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0535-3808266。E-mail:wangyiyun5253@sina.com

# 通信作者:教授,博士。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0535-3946400。E-mail:sunkaoxiang@lyue.cn

(收稿日期:2017-08-24 修回日期:2018-01-15)

(编辑:邹丽娟)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Bevacizumab (BEV) multivesicular liposomes (BEV-MVLs) with sustained-effect, and to study their *in vitro* release characteristics. METHODS: BEV-MVLs were prepared by double emulsion method. Box-Behnken design-response surface methodology was used to optimize the prescription with the concentration of glycerol trioleate (TO) in organic phase, ratio of 1, 2-di-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)-cholesterol (CH) (mol/mol), the concentration of L-lysine in external water phase as factors, using encapsulation rate as index. The morphology of BEV-MVLs was observed by inverted fluorescence microscope and SEM; particle size was determined by laser particle size analyzer; the BEV content was determined by HPLC and calculate the encapsulation rate and *in vitro* accumulative release rate. RESULTS: The optimized prescription was as follows as TO of 2.72 mmol/L in organic phase, DOPC-CH ratio of 0.67 (mol/mol) and L-lysine of 40 mmol/L in external water phase. The encapsulation rate of BEV-MVLs was  $(80.65 \pm 4.42)\%$  ( $n=3$ ), and relative error of it to predicted value was 2.54%. The liposomes were spherical in appearance shape and uniform in size, and they were typical non-concentric vesicle structure with average particle size of 16.80  $\mu\text{m}$ . 30 d *in vitro* accumulative release rate was about 92%. CONCLUSIONS: Prepared BEV-MVLs show sustained-effect, and their encapsulation rate reaches the expected effect.

**KEYWORDS** Bevacizumab; Multivesicular liposomes; Double emulsion method; Box-Behnken design-response methodology; Formulation optimization; *in vitro* release

贝伐单抗(Bevacizumab, BEV)为重组抗血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)人源化单克隆抗体,作为全球首个上市的VEGF抑制剂,其通过竞争性抑制VEGF与内皮细胞表面受体结合、特异性阻断VEGF的生物学效应、抑制内皮细胞增殖、降低血管通透性,从而阻止新生血管形成<sup>[1-2]</sup>。由于眼部脉络膜新生血管(Choroidal neovascularization, CNV)的形成与VEGF的过度表达有关<sup>[3]</sup>,临床上广泛将BEV用于眼部玻璃体注射治疗CNV异常生长导致的湿性老年性黄斑变性(Wet-age-related macular degeneration, Wet-AMD),取得明显效果<sup>[4-5]</sup>。

由于BEV在玻璃体中的消除半衰期为3~5 d<sup>[6]</sup>,Wet-AMD患者玻璃体腔频繁注射易产生眼内炎、白内障、视网膜脱落等并发症,且研究表明,随着治疗时间的推移,玻璃体腔中的蛋白水解酶会逐渐增多,导致注入玻璃体的药物分解清除速率加快<sup>[7]</sup>。因此,开发BEV的长效缓释制剂,以减少注射次数是非常必要的。

多囊脂质体(Multivesicular liposomes, MVLs),是利用贮库泡沫技术研发的一种新型脂质体<sup>[8]</sup>,适合于包封水溶性药物<sup>[9]</sup>。与普通脂质体相比,MVLs具有更大的粒径和包封容积,所以包封率较高;MVLs还具有独特的非同囊泡结构,药物释放取决于囊泡的不断破裂,因而注射给药后,能在注射部位形成良好贮库,具有缓释效果<sup>[10]</sup>。国外已有布比卡因、阿糖胞苷、硫酸吗啡的MVLs制剂成功上市<sup>[11]</sup>。本研究旨在将BEV包封于MVLs中,制备一种BEV眼部玻璃体注射给药的缓释制剂BEV-MVLs,对其处方进行优化,并对其释放特性进行评价。

## 1 材料

### 1.1 仪器

S18N-10G高速分散机和RV10旋转蒸发器(德国艾卡仪器设备有限公司);循环水式多用真空泵(郑州长城

科工贸有限公司);LC20A高效液相色谱仪(日本岛津公司);Axio Vert.A1倒置显微镜(德国卡尔蔡司光学有限公司);EM-30 Plus台式扫描电镜(韩国Coxem公司);2000激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);TG-16S台式微量高速离心机(四川蜀科仪器公司);SHA-C水浴振荡器(常州金坛良友仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

BEV原料药(山东绿叶制药有限公司,批号:YJJ192-0033-0003,纯度:98%);BEV对照品(瑞士罗氏制药有限公司,批号:N3539B01,纯度:98%);二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG,批号:556600-2140163-01)、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC,批号:560300-2150040-01/905)均购自德国Lipoid公司;三油酸甘油酯(TO,批号:20150421,化学纯)、L-赖氨酸(批号:20151207,纯度:97%)、蔗糖(批号:20151203,分析纯)、胆固醇(CH,批号:20140418,分析纯)、葡萄糖(批号:20160111,分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;人血清白蛋白(美国Sigma公司,批号:SLBT4199);曲拉通X-100(烟台赛尔生物技术有限公司,批号:C34H62011)。

## 2 方法与结果

### 2.1 BEV-MVLs的制备

采用复乳法制备BEV-MVLs。按处方称取DOPC、DPPG、TO、CH溶于1 mL的氯仿中作为有机相,向其滴加等体积含25 mg BEV的内水相[pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS),含5%蔗糖和1%人血清白蛋白],以11 500 r/min的转速高速剪切6 min形成W/O型初乳;向初乳中加入一定体积外水相(含L-赖氨酸和4%葡萄糖),以7 500 r/min的转速高速剪切1 min,形成W/O/W型复乳。将复乳转移至盛有外水相的梨形瓶中,在37 °C下旋转蒸发除掉有机溶剂,即得BEV-MVLs混悬液。

### 2.2 BEV含量检测方法的建立及包封率的计算

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Bio-Monolith Protein A(4.95 mm×5.2 mm, 0.10 mL); 流动相A: PBS(pH 7.4), 流动相B: 0.5 mol/L 醋酸溶液(pH 2.5), 梯度洗脱; 流速: 1.5 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 280 nm; 进样量: 20 μL。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0.00	100	0
0.50	0	100
3.00	0	100
3.10	100	0
8.00	100	0

2.2.2 供试品溶液的制备 取 BEV-MVLs 混悬液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 10% 曲拉通 X-100 破乳, 用 pH 7.5 的 PBS 定容, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液即得。

2.2.3 专属性考察 以不含 BEV 的空白 MVLs 作为空白溶液, 以 BEV 水溶液作为对照品溶液, 以 BEV-MVLs 混悬液作为样品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果显示, BEV 的保留时间为 2.3 min, 峰形良好, 且样品峰处无杂质干扰, 说明该分析方法具有良好的专属性。色谱图见图 1。

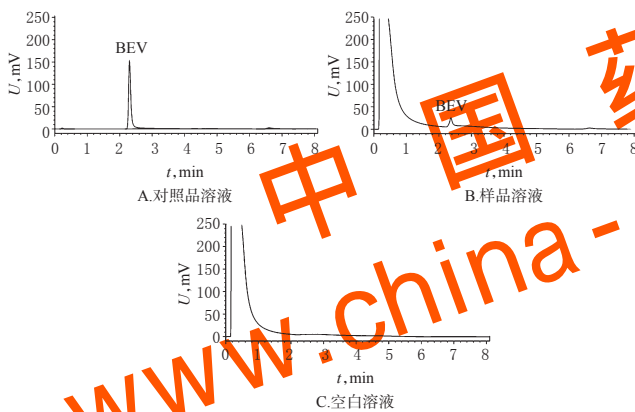


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.4 线性关系考察 取 0.05、0.5、1、2.5、5 mg/mL 的系列 BEV 对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标(y)、BEV 质量浓度为横坐标(x)进行线性回归, 得回归方程为  $y=10^6x-31\ 596$  ( $r=0.999\ 4$ ), 可知 BEV 在 0.05~5 mg/mL 质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 取 0.05、1、5 mg/mL 的 BEV 对照品溶液, 各 3 份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 同日内各测定 3 次, 连续测定 3 d, 考察日内、日间精密度。结果显示, 日内 RSD 分别为 1.63%、1.44%、0.56% ( $n=3$ ), 日间 RSD 分别为 1.51%、1.82%、0.51% ( $n=3$ ), 符合相关要求。

2.2.6 准确度考察 分别精密量取 BEV 对照品溶液

0.02、0.4、4 mL, 各 3 份, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 2 mL 空白 MVLs, 用 10% 曲拉通 X-100 破乳, 定容, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液进样测定, 记录峰面积, 计算 BEV 含量, 以测得量/加入量×100% 计算加样回收率。结果显示, 平均加样回收率分别为 99.00%、98.67%、99.03%, RSD 分别为 1.75%、1.55%、0.61% ( $n=3$ ), 符合相关要求。

2.2.7 包封率测定 取 BEV-MVLs 0.5 mL, 加生理盐水稀释, 600×g 离心 8 min, 除去上清液, 沉淀用 10% 曲拉通 X-100 破乳后, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算药物包封部分的含量  $m_{包}$ , 另取相同体积的 BEV-MVLs 直接用 10% 曲拉通 X-100 破乳, 测定并计算 BEV 总含量  $m_{总}$ , 计算包封率( $\%$ )= $m_{包}/m_{总} \times 100\%$ 。

### 2.3 Box-Behnken 设计-响应面法优化处方

根据预试验结果, 确定影响 BEV-MVLs 包封率的主要因素包括有机相中 TO 的浓度( $X_1$ , mmol/L)、DOPC-CH 的比值( $X_2$ , mol/mol)和外水相中 L-赖氨酸的浓度( $X_3$ , mmol/L), 以三者为因素, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法设计试验, 每个因素 3 个水平, 以包封率为指标(Y), 采用 Design-Expert 8.0.6 软件生成 17 组试验方案。因素与水平见表 2, Box-Behnken 设计与结果见表 3。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

因素	水平		
	低	中	高
$X_1$ , mmol/L	1.00	2.50	4.00
$X_2$	0.33	0.67	1.00
$X_3$ , mmol/L	20.00	40.00	60.00

表3 Box-Behnken 设计与结果

Tab 3 Box-Behnken design and results

序号	$X_1$ , mmol/L	$X_2$	$X_3$ , mmol/L	Y, %
1	1.00	1.00	40.00	47.55
2	1.00	0.67	60.00	61.10
3	2.50	0.67	40.00	82.60
4	4.00	1.00	40.00	50.58
5	2.50	1.00	20.00	48.30
6	2.50	0.67	40.00	84.42
7	1.00	0.67	20.00	37.20
8	2.50	1.00	60.00	68.41
9	2.50	0.67	40.00	80.58
10	2.50	0.33	20.00	61.57
11	4.00	0.33	40.00	59.25
12	2.50	0.67	40.00	76.45
13	4.00	0.67	20.00	67.70
14	4.00	0.67	60.00	71.50
15	2.50	0.67	40.00	78.78
16	1.00	0.33	40.00	45.52
17	2.50	0.33	60.00	65.32

2.3.1 回归方程的拟合 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对各因素及响应值进行回归分析, 得到拟合方程为  $Y=80.57+7.21X_1+2.10X_2+6.44X_3-2.68X_1X_2-5.03X_1X_3+4.09X_2X_3-15.68X_1^2-14.16X_2^2-5.51X_3^2$  ( $R^2=0.965\ 0$ ,  $P<0.01$ , 失拟项  $P>0.05$ )。方差分析结果见表 4。

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
模型	3 180.78	7	353.42	21.44	0.000 3
$X_1$	415.58	1	415.58	25.21	0.001 5
$X_2$	35.36	1	35.36	2.15	0.186 4
$X_3$	332.30	1	332.30	20.16	0.002 8
$X_1X_2$	28.62	1	28.62	1.74	0.229 1
$X_1X_3$	101.00	1	101.00	6.13	0.042 5
$X_2X_3$	66.91	1	66.91	4.06	0.083 8
$X_1^2$	1 035.61	1	1 035.61	62.83	0.000 1
$X_2^2$	844.00	1	844.00	51.21	0.000 2
$X_3^2$	127.74	1	127.74	7.75	0.027 1
残差	115.37	7	16.48		
失拟项	76.25	3	25.42	2.60	0.189 4
纯误差	39.12	4	9.78		
总离差	3 296.15	16			

由表4可知,模型 $P < 0.01$ ,说明达到极其显著的水平,此外失拟项 $P > 0.05$ ,说明该方程能很好拟合和预测各因素与 $Y$ 的关系,其中 $X_1$ 、 $X_3$ 、 $X_1X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 对 $Y$ 有显著影响( $P < 0.05$ )。对模型进行优化,删除方差分析表中 $P > 0.05$ 的不显著项,优化后的方程为 $Y = 80.57 + 7.21X_1 - 2.10X_2 + 6.44X_3 - 5.03X_1X_3 - 15.68X_1^2 - 14.16X_2^2 - 5.51X_3^2$  ( $R^2 = 0.936 0$ ,  $P < 0.01$ , 失拟项 $P > 0.05$ ),优化后的方程仍有统计学意义,具备良好拟合度。

2.3.2 响应面的优化与预测 基于实际试验要求,追求 $Y$ 的最大化,对模型进一步处理,各因素对 $Y$ 的响应面图和等高线图见图2。

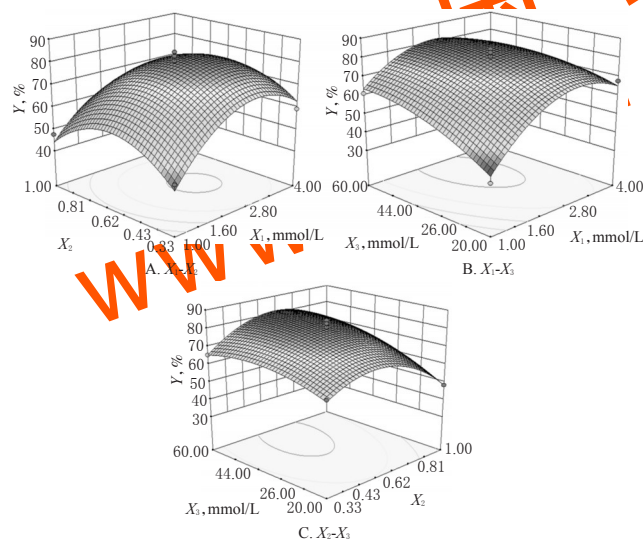


图2 各因素对 $Y$ 的响应面图和等高线图

Fig 2 Response surface plot and contour map of factors to  $Y$

响应面中的椭圆形和较陡坡度代表两因素交互作用显著,而圆形和较缓坡度代表两因素交互作用不显著,极值出现于响应面的最高处或等值线最小椭圆的中心点。3因素对BEV-MVLs的 $Y$ 影响大小为 $X_1 > X_3 > X_2$ ,与方差分析结果一致。根据各因素变量范围对 $Y$ 影响的期望值,选择优化后的处方中有机相中TO的浓度为

2.72 mmol/L、外水相中 $L$ -赖氨酸的浓度为40 mmol/L, DOPC-CH比值为0.67(mol/mol),在此条件下,模型预测包封率为82.7%。

2.3.3 最优处方的验证 为进一步验证所建立模型与实际实验结果是否相符,以软件所优化后的处方工艺即称取1.4 mmol DOPC、2.95 mmol DPPG、0.002 72 mmol TO、2.8 mmol CH溶于1 mL的氯仿中作为有机相,向其滴加等体积含25 mg BEV的内水相,按“2.1”项下方法制备成初乳;向初乳中加入4 mL外水相(含4%葡萄糖和4 mmol/L的 $L$ -赖氨酸),制备成10 mL BEV-MVLs混悬液,平行制备3批,测得包封率为 $(80.65 \pm 4.42)\%$  ( $n = 3$ ),与预测值的相对误差为2.54%,证实了该模型的有效性,且包封率达到预期效果。

## 2.4 BEV-MVLs的表征

2.4.1 形态 于倒置显微镜下观察BEV-MVLs形态,可见其外观呈球形,圆整、大小较均匀,内部由许多紧密排列的非同心囊泡构成,类似泡沫状<sup>[12]</sup>,显微镜图见图3。

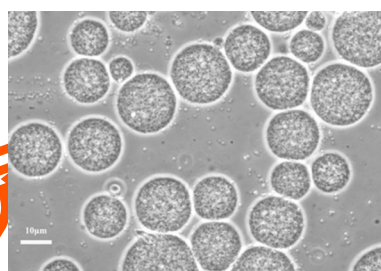


图3 BEV-MVLs的显微镜图( $\times 400$ )

Fig 3 Micrograph of BEV-MVLs( $\times 400$ )

将冻干后的BEV-MVLs固定于导电胶上,经喷金处理,制成标本,进行扫描电镜观察,可见其形态较为圆整,呈现出典型的非同心囊泡结构,扫描电镜图见图4。

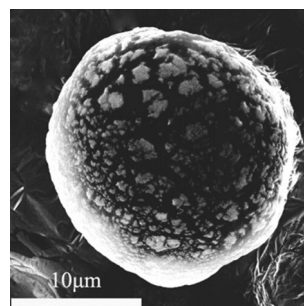


图4 BEV-MVLs的扫描电镜图( $\times 262$ )

Fig 4 Scanning electron micrograph of BEV-MVLs( $\times 262$ )

2.4.2 粒径 采用激光粒度仪测定BEV-MVLs的粒径,得到粒径分布曲线。结果显示,BEV-MVLs粒径分布为11.13~24.96  $\mu\text{m}$ ,平均粒径为16.80  $\mu\text{m}$ ,粒径分布宽度适宜,对称性良好,粒径分布图见图5。

## 2.5 体外释放特性

取BEV-MVLs 5 mL于10 mL EP管中,离心除去上清液,沉淀中加入2 mL释放介质(pH 7.4的PBS)并混

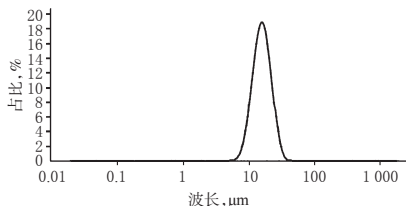


图5 BEV-MVLs的粒径分布图

Fig 5 Distribution of particle size of BEV-MVLs

匀,放入 37 °C 水浴振荡器(30 r/min)中进行释放试验。于 0、0.5、1、3、5、7、10、14、17、21、25、30 d 各时间点取样,将释放液 600×g 离心 8 min,取上清液 0.2 mL,同时补加等温等体积释放介质,测定释放样品中 BEV 含量,计算累积释放度,绘制释放曲线,体外累积释放曲线见图 6。

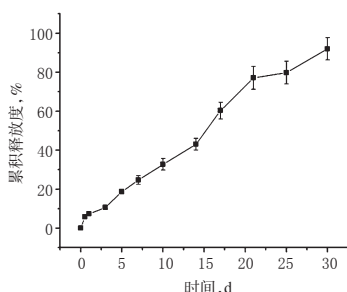


图6 BEV-MVLs 体外累积释放曲线

Fig 6 Accumulative drug release curves of BEV-MVLs

由图 6 可知,采用 pH 7.4 PBS 作为释放介质模拟眼部玻璃体环境,所得数据能较好地反映制剂在体外的缓释效果,30 d 时的累积释放度达 92%。将释放数据用不同的释放模型拟合,最终确定其最佳拟合模型为一级释放模型,其方程为  $y=295.876(1-e^{-0.013x})$  ( $R^2=0.987$ ),即 BEV-MVLs 的释放机制近似于单个囊泡破裂而导致的骨架溶蚀型释放,而不是简单的药物扩散;随着外部单个囊泡的扩散和表面溶蚀,包封的药物释放出来,但内部未发生破裂的囊泡仍可保持非同心的圆结构,依然维持缓释作用效果,因而药物释放时间得到延长。

### 3 讨论

单抗药物含量分析常用二喹啉甲酸(BCA)法和酶联免疫吸附(ELISA)法,前者是测定样品中蛋白总浓度,后者检测蛋白浓度通常为 pg 级,样品需稀释很高倍数才能分析,两种方法准确度均不高。本研究采用 Protein A 色谱柱分析 BEV 含量,Protein A 是金黄色葡萄球菌 A 蛋白,能与抗体片段 Fc 区域(主要是免疫球蛋白 G)特异性结合,其他组分不被结合而流出,改变流动相 pH 值可使抗体与 Protein A 分开而被洗脱下来,从而准确定量抗体浓度,与 ELISA 法检测相比,操作简单、高速快捷<sup>[13]</sup>。

在 W/O/W 法制备 BEV-MVLs 过程中,有两个因素影响蛋白质稳定性:一是油水界面吸附作用;二是均质乳化产生的压力。本研究在内水相中添加蛋白质稳定剂蔗糖,以减少蛋白质动力学作用,阻断蛋白质在油水界面的聚集和变性,加强蛋白质疏水性氨基酸之间的相

互作用,提高蛋白质耐热性和稳定性。在处方中加入白蛋白能够有效保护抗体对抗均质乳化过程中的压力,降低界面吸附作用,保护抗体活性。

综上所述,本研究成功制得具有缓释作用的 BEV-MVLs,其包封率达到预期效果。

### 参考文献

- [1] ABRISHAMI M, GANAVATI SZ, SOROUGH D, et al. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (avastin) for intravitreal administration[J]. *Retina*, 2009, 29(5): 699-703.
- [2] RADHAKRISHNAN K, SONALI N, MORENO M, et al. Protein delivery to the back of the eye: barriers, carriers and stability of anti-VEGF proteins[J]. *Drug Discov Today*, 2016, 22(2): 416-423.
- [3] OSSWALD CR, KANG-MIELER JJ. Controlled and extended in vitro release of bioactive anti-vascular endothelial growth factors from a microsphere-hydrogel drug delivery system[J]. *Current Eye Research*, 2016, 41(9): 1216-1222.
- [4] GUNTHER JB, ALLAWHEEL MM. Bevacizumab (Avastin) for the treatment of ocular disease[J]. *Survey of Ophthalmology*, 2009, 54(3): 372-400.
- [5] 易伟斌, 胡竹林. Avastin 在眼部新生血管性疾病中的应用进展[J]. *眼科新进展*, 2007, 27(11): 874-877.
- [6] MOISSEIEV E, WAISBOURD M, BEN-ARTSI E, et al. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical and intravitreal administration in human eyes[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(2): 331-337.
- [7] BAKRI SJ, SNYDER MR, REID JM, et al. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin) [J]. *Ophthalmology*, 2007, 114(5): 855-859.
- [8] 王晓梅, 唐星, 何海冰. 多囊脂质体的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2006, 15(15): 1243-1246.
- [9] 李晗, 梅兴国. 多囊脂质体递送蛋白质/多肽类药物的研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(2): 94-98.
- [10] 张然然, 孙艳冬, 赵源, 等. 处方及工艺因素对多囊脂质体质量影响的研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47(7): 929-933.
- [11] ANGST MS, DROVER DR. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2006, 45(12): 1153-1176.
- [12] 曾慧琳, 符旭东. 多囊脂质体在递药系统中的应用研究进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(37): 3526-3528.
- [13] 邹有土, 郑和东, 阮卡, 等. 贝伐珠单抗克隆抗体的 HPLC 定量检测方法的建立[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(6): 1027-1031.

(收稿日期: 2017-09-21 修回日期: 2017-12-06)

(编辑: 邹丽娟)