

文章编号 1006-8147(2014)04-0329-03

论 著

多种环孢菌素 A 眼用制剂稳定性与结膜刺激性研究

连晓佳^{1,2}, 张 瑞¹, 周 波², 郭 刚¹

(1.天津医科大学代谢病医院内分泌研究所, 卫生部激素与发育重点实验室, 天津 300070; 2.天津药业研究院有限公司, 天津 300457)

摘要 目的: 制备环孢菌素 A 的不同制剂, 筛选在稳定性、刺激性方面均良好的处方。方法: 选用不同的乳化剂组合(吐温 80、聚氧乙烯 35 蓖麻油、聚乙二醇 15 硬脂酸酯)制备样品, 经稳定性试验后考察各处方的稳定性, 同时考察各自的刺激性。结果: 采用聚乙二醇 15 硬脂酸酯乳化的环孢菌素 A 制剂稳定性良好, 刺激性较小。结论: 避免使用吐温 80 作为乳化剂可以降低结膜刺激产生的风险。

关键词 环孢菌素 A; 聚氧乙烯 35 蓖麻油; 聚乙二醇 15 硬脂酸酯; 结膜刺激性; 眼用制剂

中图分类号 R92

文献标志码 A

角结膜干燥症(KCS), 俗称干眼症, 会引起泪液分泌抑制。目前存在人工泪液、糖皮质激素和环孢菌素 A (cyclosporine A) 3 种治疗途径。其中, 人工泪液是治疗干眼症的主要方式, 尽管它可以起到保温、润滑、营养角膜的作用, 但不能从根本上解决干眼症的炎症问题; 局部用糖皮质激素是有效的抗炎剂, 但因其副反应而不能长期使用; 环孢菌素 A 是由 11 种氨基酸组成的环状多肽化合物的新一代强效免疫抑制剂^[1], 是一种真菌的活性代谢物^[2], 具有抑制 T-淋巴细胞和 B-淋巴细胞增殖的作用, 局部用环孢菌素是目前美国 FDA 批准的唯一一个治疗干眼症的处方药, 它通过抑制炎症细胞、细胞因子的产生和成纤维细胞的活化, 从而抑制泪腺中淋巴细胞的浸润, 减少炎症反应, 同时还可抑制泪腺组织的瘢痕化^[3], 安全有效, 可长期使用。它不仅可缓解症状, 更可以从根本治疗干眼症的炎症问题。在我国干眼症的发病率比较高, 成人中年发病率约为 15%^[4]。本试验通过选用不同的乳化剂制备环孢菌素 A 的不同制剂, 考察各处方的稳定性和结膜刺激性。

1 材料和方法

1.1 材料 环孢菌素 A (台山市化学制药厂, 结构式见图 1), 甘油 (遂昌惠康药业), 蓖麻油 (湖北科田药业), 吐温 80 (上海申宇化工), 丙二醇 (南京威尔化工), 聚氧乙烯 35 蓖麻油 (德国 BASF)^[5], 聚乙二醇 15 硬脂酸酯 (德国 BASF), 卡波姆 1342 (广州市汉普医药)^[5]。

1.2 仪器 高剪切乳化机 (Fluko FA25); 高压乳匀机 (Niro Soavi NS1001L); 马尔文激光粒度仪 (Mastersizer 2000); 恒温恒湿箱 (Climacell 404)。

作者简介 连晓佳 (1982-), 女, 硕士在读, 研究方向: 生物制药; Lxj_win@126.com。

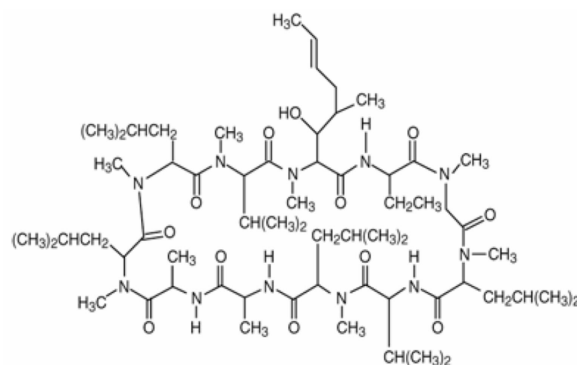


图 1 环孢菌素 A 结构式

1.3 实验方法 环孢菌素 A 乳剂主要由油相、乳化剂、等渗调节剂、稳定剂 4 部分组成。本试验通过筛选不同的处方, 制备样品, 并考察其稳定性和刺激性。

1.3.1 处方 1 (市售处方)

1.3.1.1 处方组成: 由于国内并无药用辅料资质的 PemulenTM 产品, 所以采用 0.05% 的卡波姆 1342 代替。其他保持不变, 采用 0.625% 的蓖麻油作为油相, 1% 的吐温 80 作为乳化剂, 2.2% 的甘油作为等渗调节剂。

1.3.1.2 制备工艺^[6-7]: 首先将吐温 80 与蓖麻油在 70 °C 下搅拌均匀, 加入环孢菌素, 继续搅拌溶清。甘油溶于全量水中, 作为水相, 并加热至 70 °C 保温。在 13 000 转高速剪切下, 将油相注入水相中, 加毕, 继续剪切 10 min。制成初乳后, 经 80/800 bar 乳匀 6 次, 以氢氧化钠调节 pH 值至 7.2, 过 0.22 μm 滤膜, 得到成品。

1.3.2 处方 2

1.3.2.1 处方组成: 近年来关于吐温 80 的刺激性报道不断, 而聚氧乙烯 35 蓖麻油 (Cremophor EL) 无刺激且具有良好的亲水性。处方 2 中保持卡波姆 1342

替代市售处方中 Pemulen™, 并且以 1.5% 的聚氧乙烯 35 蓖麻油代替吐温 80, 为保证等渗, 增加甘油的比例至 2.3%。

1.3.2.2 制备工艺: 取 0.05% 的环孢菌素 A 溶于加热至 70 ℃ 的蓖麻油中, 搅拌溶清。聚氧乙烯 35 蓖麻油与甘油一起溶于全量水中, 作为水相, 并保温至 70 ℃。在 13 000 转高速剪切下, 将油相注入水相中, 加毕, 继续剪切 10 min。制成初乳后, 经 80/800 bar 乳匀 6 次, 以氢氧化钠调节 pH 值至 7.2, 过 0.22 μm 滤膜, 得到成品。

1.3.3 处方 3

1.3.3.1 处方组成: 聚乙二醇 15 硬脂酸酯(Solutol® HS15)是一种聚乙二醇(PEG)十二羟基硬脂酸酯, 具有优化特性的替代性增溶剂, 具有良好的生理耐受性和对多种药物的高溶解能力。处方 3 中保持卡波姆 1342 替代市售处方中 Pemulen™, 并且以 0.5% 的聚乙二醇 15 硬脂酸酯代替吐温 80, 为保证等渗, 调整甘油的比例至 2.3%。

1.3.3.2 制备工艺: 取 0.05% 的环孢菌素 A 溶于加热至 70 ℃ 的蓖麻油中, 搅拌溶清。聚乙二醇 15 硬脂酸酯与甘油一起溶于全量水中, 作为水相, 并保温至 70 ℃。在 13 000 转高速剪切下, 将油相注入水相中, 加毕, 继续剪切 10 min。制成初乳后, 经 80/800 bar 乳匀 6 次, 以氢氧化钠调节 pH 值至 7.2, 过 0.22 μm 滤膜, 得到成品。

1.4 处方的评价指标

1.4.1 外观考察 各稳定性试验前后, 药液的颜色、状态是否发生变化, 是否出现破乳。

1.4.2 粒径考察 各稳定性试验前后, 粒径是否始终满足限度($d_{0.5} < 0.22 \mu\text{m}$, $d_{0.9} < 0.45 \mu\text{m}$)。

1.4.3 渗透压考察 各稳定性试验前后, 渗透压是否始终处于 230~320 mOsm/kg 范围内。

1.4.4 pH 值考察 各稳定性试验前后, pH 值是否始终处于 6.5~8.0 区间内。

1.4.5 含量考察 各稳定性试验前后, 含量是否出现了显著性变化, 当含量变化值超过 5% 则认为出现了显著性变化。

1.5 影响因素试验 将样品分别在 60 ℃、40 ℃ 和照度为 $(4\ 500 \pm 500)$ Lx 条件下放置 10 d, 分别于第 5 天和第 10 天取样检测。

1.6 低温循环试验 低温试验的每次循环是先于 2~8 ℃ 放置 2 d, 再在 40 ℃ 放置 2 d, 取样检测。记作一个循环, 连续进行 3 次循环。

1.7 兔眼刺激性实验

1.7.1 预选动物 肉眼观察角膜无混浊, 结膜无充

血、水肿及分泌物, 瞳孔圆形, 两侧等大, 对光反射良好。裂隙灯检查角膜透明, 无云翳、斑翳, 虹膜纹理清晰, 结膜无充血水肿。

荧光素染色: 10% 荧光素钠注射液, 临用前用生理盐水稀释 10 倍, 用无菌玻棒沾取少许 1% 荧光素钠液于每兔眼滴 1 滴, 2 min 后观察角膜未着色者为角膜正常, 再用生理盐水冲洗, 将结膜囊冲洗干净待用。经上述预选出无眼疾且健康的家兔用于本试验。

1.7.2 空白水剂的配制 2.6% 的甘油溶于全量水中, 加入 0.05% 的卡波姆 1342, 溶清。以氢氧化钠调节 pH 值至 7.2, 过 0.22 μm 滤膜, 得到空白水剂。

1.7.3 眨眼次数测定 取预选健康动物 12 只, 雌雄兼用, 分成 3 组, 每组 4 只, 每组对应一个处方的制剂。将每只动物眼睫毛剪去, 分别给每只动物左侧眼结膜囊内滴环孢素 A 乳液 0.1 mL, 右侧眼结膜囊内滴自制的空白水剂 0.1 mL 为对照。每次给药时压迫鼻泪管, 并使眼被动闭合 8~10 s, 随后立即记录 10 min 内眨眼次数, 分别计算每组 4 只动物左、右眼平均眨眼次数, 评价药物对眼的刺激性。

1.7.4 短期多次给药眼刺激实验 各组均每 15 min 点眼 1 次, 连续给药 2 h。将兔子全麻, 荧光素染色, 裂隙灯观察眼表情况(角膜, 结膜, 虹膜), 记录给药后(1、6、12、24 h)眼的局部刺激反应情况。

1.7.5 长期给药眼刺激实验 每日 2 次, 连续给药 4 周。实验开始后每周观察并记录至实验结束。

2 结果

2.1 3 种处方的影响因素试验 处方 1 制备的样品在 60 ℃ 条件下会出现明显的漂油甚至破乳, 在 40 ℃ 和光照条件下指标可以保持相对稳定(粒径、pH 值和含量)。处方 2 制备的样品在 60 ℃ 条件下出现了与处方 1 相似的现象, 在 40 ℃ 和光照条件下指标可以保持相对稳定(粒径、pH 值和含量)。处方 3 制备的样品在 60 ℃ 条件下出现了与处方 1 相似的现象, 在 40 ℃ 和光照条件下指标最为稳定(粒径、pH 值和含量)。

综合比较上述 3 个处方, 虽然在高温(60 ℃)条件下均不稳定, 但在 40 ℃ 条件下质量可以保持稳定, 这与 FDA 说明书所记载的储存条件相符。相比较而言, 处方 2 和处方 3 在高温下的稳定性优于处方 1; 处方 2 的粒径在 3 个处方中是最小的, 有利于除菌过滤工艺的实现; 处方 3 的含量在 40 ℃ 和光照条件下变化最小, 这表明处方 3 的相对稳定性最佳, 见表 1。

表1 3种处方的影响因素试验

处方	外观	粒径	渗透压	pH 值	含量/%
处方 1-0 时	蓝色光泽、澄明	0.208;0.360	273	7.1	99
处方 1-40 ℃5 d	蓝色光泽、澄明	0.207;0.364	280	7.1	97
处方 1-60 ℃5 d	乳白色,有油花	0.260;0.730	290	7.2	92
处方 1-光照 5 d	蓝色光泽、澄明	0.205;0.361	275	7.1	100
处方 1-40 ℃10 d	蓝色光泽、澄明	0.209;0.367	278	7.3	96
处方 1-60 ℃10 d	破乳	—	—	—	—
处方 1-光照 10 d	蓝色光泽、澄明	0.209;0.362	275	7.2	99
处方 2-0 时	蓝色光泽、澄明	0.161;0.228	280	7.1	101
处方 2-40 ℃5 d	蓝色光泽、澄明	0.164;0.230	281	7.2	97
处方 2-60 ℃5 d	乳白色,有油花	0.212;0.478	285	7.4	94
处方 2-光照 5 d	蓝色光泽、澄明	0.163;0.228	274	7.1	97
处方 2-40 ℃10 d	蓝色光泽、澄明	0.167;0.230	271	7.0	98
处方 2-60 ℃10 d	破乳	—	—	—	—
处方 2-光照 10 d	蓝色光泽、澄明	0.165;0.224	276	7.1	96
处方 3-0 时	蓝色光泽、澄明	0.187;0.212	282	7.2	101
处方 3-40 ℃5 d	蓝色光泽、澄明	0.174;0.217	286	7.3	99
处方 3-60 ℃5 d	乳白色,有油花	0.197;0.485	277	7.0	93
处方 3-光照 5 d	蓝色光泽、澄明	0.183;0.217	280	7.0	98
处方 3-40 ℃10 d	蓝色光泽、澄明	0.185;0.215	283	7.2	102
处方 3-60 ℃10 d	破乳	—	—	—	—
处方 3-光照 10 d	蓝色光泽、澄明	0.192;0.211	285	7.1	99

2.2 3种处方的低温循环试验 处方1在经历低温循环试验1次后出现破乳;处方2在第1次循环后粒径增大,第2次循环后粒径显著增大且出现了漂油,第3次循环时出现了破乳;处方3在第1次循环后粒径稍有增大,但在第2次循环后出现了破乳。综上,由于处方2的第2次循环的指标已经出现了显著变化,所以处方2与处方3在低温循环试验上无显著的差异,见表2。

表2 3种处方的低温循环试验

处方	外观	粒径	渗透压	pH 值	含量/%
处方 1-0 时	蓝色光泽、澄明	0.208;0.360	273	7.1	99
处方 1-循环 1	破乳	—	—	—	—
处方 1-循环 2	破乳	—	—	—	—
处方 1-循环 3	破乳	—	—	—	—
处方 2-0 时	蓝色光泽、澄明	0.161;0.228	280	7.1	101
处方 2-循环 1	蓝色光泽、澄明	0.188;0.241	283	7.2	96
处方 2-循环 2	乳白色,有油花	0.280;0.680	294	7.4	91
处方 2-循环 3	破乳	—	—	—	—
处方 3-0 时	蓝色光泽、澄明	0.187;0.212	282	7.2	101
处方 3-循环 1	蓝色光泽、澄明	0.190;0.215	286	7.3	97
处方 3-循环 2	破乳	—	—	—	—
处方 3-循环 3	破乳	—	—	—	—

2.3 眨眼次数 自制环孢素 A 滴眼液处方1、处方2、处方3的家兔眨眼次数实验见表3,供试组为各

自的自制样品,对照组均为空白水剂。处方1中家兔眨眼次数高于处方2和处方3,而处方2与处方3结果相近,这说明处方1的结膜刺激性大于处方2和处方3,见表3。

表3 兔眨眼次数测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

处方	组别	眨眼次数(10 min)	P
处方 1	供试组(左)	7.6±1.56	<0.05
	对照组(右)	7.1±0.72	—
处方 2	供试组(左)	7.4±1.34	>0.05
	对照组(右)	7.1±0.89	—
处方 3	供试组(左)	7.3±1.05	>0.05
	对照组(右)	7.1±0.66	—

2.4 眼刺激实验 按照眼刺激反应评分标准,将每只动物的角膜、虹膜和结膜刺激反应的分值相加即是1只受试动物眼刺激反应的总积分。把每个受试动物的刺激反应的总积分除以动物数,就是该受试动物组对眼刺激性的最后分值。结果显示无论短期多次给药(表4)还是长期给药(表5),处方1对结膜的刺激性均为中度刺激性,明显高于处方2和处方3的轻度刺激性。

表4 3种处方对兔眼刺激性评分(短期多次)

部位	处方 1	处方 2	处方 3	空白水剂
角膜	2	1	1	0
虹膜	1	1	1	0
结膜	6	4	2	0
总积分	9	6	4	0
眼刺激性评价	中度刺激性	轻度刺激性	轻度刺激性	无刺激性

表5 3种处方对兔眼刺激性评分(长期给药)

部位	处方 1	处方 2	处方 3	空白水剂
角膜	2	2	1	0
虹膜	1	1	1	0
结膜	7	4	3	0
总积分	10	7	5	0
眼刺激性评价	中度刺激性	轻度刺激性	轻度刺激性	无刺激性

3 讨论

中国药典2010年版中将滴眼剂提升为无菌制剂,对其微生物情况提出了更高水平的要求。将滴眼液装入单剂量包装中,避免添加防腐剂引起的刺激,则是一个发展方向。本试验设计环孢菌素 A 制剂拟采用除菌过滤后单剂量包装的工艺,所以不添加防腐剂。

家兔的眼部刺激性实验数据说明环孢菌素 A 乳液相对于空白水剂均有一定的刺激性,其中以吐温 80 为乳化剂的处方刺激性较大,此前关于吐温

(下转封三)

- of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(9): 615
- [2] 王雪莹, 王瑞安. 雌激素受体在肿瘤中的生物学作用[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(3): 625
- [3] Nguyen H D, Phan T T, Carraz M, et al. Estrogen receptor α/β -co-factor motif interactions; interplay of tyrosine 537/488 phosphorylation and LXXLL motifs[J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(12): 3134
- [4] Bolt M J, Stossi F, Newberg J Y, et al. Coactivators enable glucocorticoid receptor recruitment to fine-tune estrogen receptor transcriptional responses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 4036
- [5] York B, O'malley B W. Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(50): 38743
- [6] Lanz R B, Bulynko Y, Malovannaya A, et al. Global characterization of transcriptional impact of the SRC-3 coregulator[J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(4): 859
- [7] Fenne I S, Helland T, Flåeng M H, et al. Downregulation of steroid receptor coactivator-2 modulates estrogen-responsive genes and stimulates proliferation of mcf-7 breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70096
- [8] Johnson A B, O'malley B W. Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based Cancer therapy[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 348(2): 430
- [9] Moi L L, Flåeng M H, Gjerde J, et al. Steroid receptor coactivators, HER-2 and HER-3 expression is stimulated by tamoxifen treatment in DMBA-induced breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 247
- [10] Palmieri C, Gojis O, Rudraraju B, et al. Expression of steroid receptor coactivator 3 in ovarian epithelial cancer is a poor prognostic factor and a marker for platinum resistance[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(10): 2039
- [11] Thigpen T, Dubois A, Mcalpine J, et al. First-line therapy in ovarian cancer trials[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(4): 756
- [12] Geng C, He B, Xu L, et al. Prostate cancer-associated mutations in speckle-type POZ protein (SPOP) regulate steroid receptor coactivator 3 protein turnover[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(17): 6997
- [13] Ou C W, Sun M, Sadej W, et al. Expression of nuclear receptor coactivators in the human fetal membranes at term before and after labor[J]. *Obstet Gynecol Int*, 2012, 2012: 717294
- [14] Suzuki A, Horiuchi A, Oka K, et al. Immunohistochemical detection of steroid receptor cofactors in ovarian endometriosis: involvement of down-regulated SRC-1 expression in the limited growth activity of the endometriotic epithelium[J]. *Virchows Arch*, 2010, 456(4): 433
- [15] Kumagami A, Ito A, Yoshida-Komiya H, et al. Expression patterns of the steroid receptor coactivator family in human ovarian endometriosis[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2011, 37(10): 1269
- [16] Han S J, Hawkins S M, Begum K, et al. A new isoform of steroid receptor coactivator-1 is crucial for pathogenic progression of endometriosis[J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1102
- [17] Hsia E Y, Goodson M L, Zou J X, et al. Nuclear receptor coregulators as a new paradigm for therapeutic targeting[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(13): 1227
- [18] Wang Y, Lonard D M, Yu Y, et al. Small molecule inhibition of the steroid receptor coactivators, SRC-3 and SRC-1[J]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(12): 2041
- [19] Wang Y, Lonard D M, Yu Y, et al. Bufalin is a potent small-molecule inhibitor of the steroid receptor coactivators SRC-3 and SRC-1[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(5): 1506
- [20] Khan J A, Tikad A, Fay M, et al. A new strategy for selective targeting of progesterone receptor with passive antagonists[J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(6): 909
- [21] Taylor B S, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer[J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(1): 11

(2014-03-24 收稿)

(上接第 331 页)

80 在注射剂中使用也有同类报道。聚乙二醇 15 硬脂酸酯乳化剂的刺激性比聚氧乙烯 35 蓖麻油略小。

表面活性剂是除防腐剂之外另一个可能引起刺激性的添加剂,本试验中分别选择吐温 80、聚氧乙烯 35 蓖麻油、聚乙二醇 15 硬脂酸酯 3 种表面活性剂。通过影响因素和低温循环试验,对比对应制剂的稳定性。同时,通过对家兔的眼部刺激性考察对其安全性进行预测。

采用聚乙二醇 15 硬脂酸酯作为乳化剂时,乳液的粒径均一度较高,采用除菌过滤时阻力小,进行生产规模放大时可行性高。当对比 3 个供试处方的影响因素数据,3 种表面活性剂制备的乳剂在 40℃和光照试验中含量、pH 值、渗透压、粒径等质量指标均可以保持相当的稳定性,且区别不大,但在高温 60℃的条件下稳定性不足,容易发生破乳。以聚氧乙烯 35 蓖麻油为乳化剂制备的处方在低温循环中稳定性最佳,以吐温 80 和聚乙二醇 15 硬脂酸酯为乳化剂的处方在经历一个低温循环后均出

现了破乳。本次试验中所观察到的现象与原研说明书中阐明的储存条件(15~25℃)相符。

综合考虑不同乳化剂处方的效用与风险,我们将进一步研究聚乙二醇 15 硬脂酸酯乳化剂处方的制剂特性,尤其是替代 PemulenTM 的其他合适辅料。

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[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2010, 248(8): 1167
- [2] 蒋正立. 环孢素 A 制剂的研究进展[J]. *海峡药学*, 2005, 17(4): 8
- [3] 雷海云. 干眼症研究进展的综述[J]. *中外健康文摘*, 2011, 8(27): 424
- [4] 蔡晓红. 杞菊地黄丸辅助玻璃酸钠治疗干眼症的疗效观察[J]. *中国疗养医学*, 2013, 22(12): 1070
- [5] 上海医药工业研究院药物制剂部, 药物制剂国家工程研究中心. 药用辅料应用技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 339
- [6] 屠锡德. 药剂学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 392-392
- [7] Senju P C, Mitsubishi C C. Compositions containing difluprednate: United States, 6114319 [P]. 2000-09-05

(2014-02-21 收稿)