

## Preparation and characterization of amphiphilic lipopeptide nanosuspension lyophilized powder

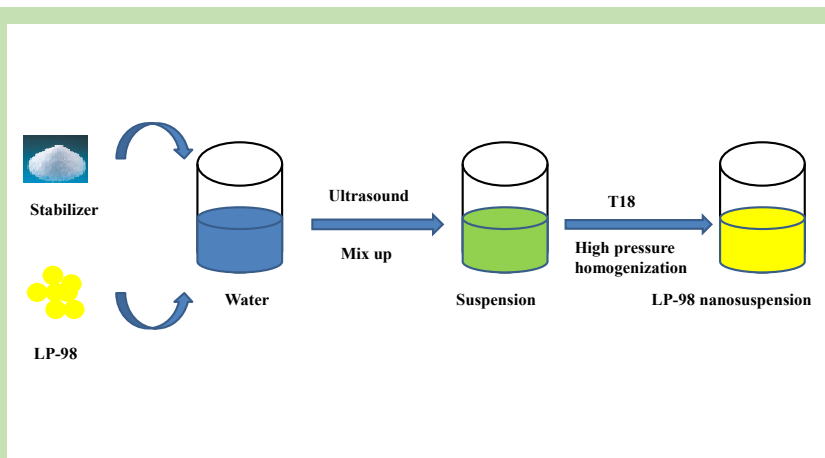
Mengqiu ZHANG<sup>1</sup>, Huijuan JIN<sup>2</sup>, Fangling GONG<sup>2</sup>, Youhong ZHANG<sup>1\*</sup>, Yi WEI<sup>2\*</sup>,  
Yuxian HE<sup>3</sup>, Guanghui MA<sup>2</sup>

1. School of Environmental Ecology and Bioengineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan, Hubei 430205, China

2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3. MOH Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens, Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100190, China

**Abstract:** AIDS has spread widely and become a serious public health problem around the world. Membrane fusion inhibitor LP-98 shows strong antiviral activity among the anti-AIDS drugs under study in China, and has broad clinical application prospects. However, the clinical application of LP-98 is limited by its low solubility and poor suspension ability in aqueous phase, which could lead to blocked needle during injection and patient's pain. To improve solubility of LP-



98, high-pressure homogenization technology was used to prepare LP-98 nanosuspension lyophilized powder (LP-98 NSLP). The optimal preparation process was as follow: the optimum stabilizer was sodium dodecyl sulfate (SDS), the concentration of SDS was 0.80wt%, the high-pressure homogenization pressure was 150 MPa, and it was repeated 5 times. The physical and chemical characterization and pharmacokinetics study of LP-98 NSLP were investigated. The LP-98 nanosuspension lyophilized powder had an average particle size of  $261.5 \pm 1.1$  nm and a Zeta potential of  $-31.5 \pm 0.2$  mV. Circular dichroism spectrometer and single-cycle virus infection experiments showed that the structure and biological activity of active pharmaceutical ingredients (API) were unchanged. The pharmacokinetic results showed that the bioavailability of the LP-98 NSLP was 98.1% of API. The solubility of LP-98 in water has been increased from 184  $\mu\text{g/mL}$  to 1733  $\mu\text{g/mL}$ , which was 8 times higher than that of the API. The drug activity in the LP-98 nanosuspension lyophilized powder was well preserved, and the solubility of the drug was improved. As a result it solved the problem of blocked needle during injection due to poor suspension of LP-98, hence reduced patient's pain. This research promoted the development of LP-98 application in clinical.

**Key words:** amphiphilic lipopeptide; nanosuspension; high-pressure homogenization; solubility; pharmacokinetics

收稿: 2020-04-30, 修回: 2020-05-27, 网络发表: 2020-08-26, Received: 2020-04-30, Revised: 2020-05-27, Published online: 2020-08-26

基金项目: 国家重大科技专项(编号: 2018ZX10301103-003)

作者简介: 张梦秋(1995-), 女, 湖北省襄阳市人, 硕士研究生, 生物化工专业, E-mail: Blythe1995@126.com; 通讯联系人, 张佑红, E-mail: youhong@aliyun.com; 韦祎, E-mail: ywei@ipe.ac.cn.

**引用格式:** 张梦秋, 靳惠娟, 巩方玲, 等. 两性脂肽纳米混悬液冻干粉的制备及其表征. 过程工程学报, 2021, 21(4): 463-470.

Zhang M Q, Jin H J, Gong F L, et al. Preparation and characterization of amphiphilic lipopeptide nanosuspension lyophilized powder (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2021, 21(4): 463-470, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.220144.

## 两亲性脂肽纳米混悬液冻干粉的制备及其表征

张梦秋<sup>1</sup>, 靳惠娟<sup>2</sup>, 巩方玲<sup>2</sup>, 张佑红<sup>1\*</sup>, 韦祎<sup>2\*</sup>, 何玉先<sup>3</sup>, 马光辉<sup>2</sup>

1. 武汉工程大学环境生态与生物工程学院, 湖北 武汉 430205

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190

3. 中国医学科学院北京协和医学院病原生物学研究所, 卫生部病原体系统生物学教育部重点实验室, 北京 100190

**摘要:**为解决抗艾滋药物两亲性脂肽 LP-98 溶解度低的问题, 采用高压均质技术制备 LP-98 纳米混悬液冻干粉, 并对其进行理化性质表征及药代动力学研究。最优制备工艺为: 稳定剂为 SDS, 浓度为 0.80wt%, 高压均质压力为 150 MPa, 高压均质次数为 5 次。制备得到的 LP-98 纳米混悬液冻干粉复溶后平均粒径为  $261.5 \pm 1.1$  nm, Zeta 电位为  $-31.5 \pm 0.2$  mV。圆二色光谱仪与单周期病毒感染实验结果显示 LP-98 的结构与生物活性均未改变。药代动力学结果表明, LP-98 纳米混悬液冻干粉生物利用度为原料药的 98.1%。LP-98 在水中溶解度由 184  $\mu\text{g/mL}$  提升至 1733  $\mu\text{g/mL}$ , 与原料药相比提高了 8 倍, 解决了注射时药物难混悬的问题。

**关键词:** 两亲性脂肽; 纳米混悬液; 高压均质法; 溶解度; 药代动力学

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2021)04-0463-08

### 1 前言

人类免疫缺陷病毒(HIV)传播范围广, 感染能力强, 每年新增感染人数高达一百多万<sup>[1]</sup>, 而且感染后无法彻底治愈, 患者需终身服用抗逆转录病毒药物。中国疫情也极为严重<sup>[2]</sup>, 近年来国家致力于开发治疗与预防艾滋病的新药, 但是除了艾博卫泰<sup>[3-5]</sup>外, 我国尚无其他药物成功投入使用。Chong 等<sup>[6-10]</sup>研制出一系列 HIV 膜融合抑制剂, 在抑制不同的人类免疫缺陷病毒和猿猴免疫缺陷病毒中表现出较高的活性, 其中 LP-98 活性最显著。LP-98 作为膜融合抑制剂, 可将病毒阻断在细胞外, 在病毒复制的初期阶段发挥抑制作用, 因此在治疗与预防艾滋病方面都具有极大的临床应用前景, 丰富国内艾滋病防治药物市场的潜力。因 LP-98 由多肽链和脂肪链构成, 其结构特殊, 在水中和有机溶剂中的溶解度均较低, 注射时容易堵塞针头。为解决该问题, 一般采用一定浓度的氨水(pH 约为 10)溶解药物以提高溶解度, 大量研究表明注射剂 pH 与体液(pH 约 7.4)越接近, 患者注射疼痛感越低<sup>[11-13]</sup>, 氨水由于 pH 过高不适用于临床上的长期使用, 限制了 LP-98 的应用发展。

研究<sup>[14-17]</sup>表明, 采用合适的药物制剂技术, 可以提高难溶药物在水中的溶解度。纳米混悬液剂型<sup>[18-21]</sup>可以通过将药物颗粒纳米化, 大大增加药物在不同溶剂中的溶解度。它由少量稳定剂与药物组成的胶体分散体系, 依靠少量表面活性剂维持稳定, 使用辅料少, 安全性较

高。根据纳米粒子形成方式的不同, 现有的纳米混悬液制备技术主要分两大类: bottom-up<sup>[22,23]</sup>技术与 top-down<sup>[24-27]</sup>技术, bottom-up 技术先将药物溶解再通过一定处理使其重新聚集成纳米颗粒, 如沉淀法; top-down 技术是通过机械力将大的药物颗粒粉碎成小的纳米药物, 如高压均质法和介质研磨法。由于 bottom-up 技术存在有机溶剂残留且粒径难以控制, 现在还未出现上市产品。而 top-down 技术只需借助机械外力作用, 降低药物颗粒粒径, 操作简单, 已经有较多上市产品。难溶性药物在通过纳米化处理后, 颗粒粒径减小, 比表面积增加, 有助于药物溶解度的提高。

为增加两亲性脂肽 LP-98 在水中的溶解度, 解决 LP-98 注射过程中堵针及大颗粒注射产生疼痛的问题, 本研究使用高压均质技术制备 LP-98 纳米混悬液冻干粉。与其他难溶药物相比, 本研究面临着几项挑战: 首先, LP-98 作为一类两亲性脂肽药物, 多肽链段在进行处理时极易遭到破坏, 可能会影响其活性; 两亲性药物容易自聚集成大的颗粒, 影响其稳定性。本研究考察了稳定剂种类、稳定剂浓度、高压均质压力循环次数等参数对 LP-98 纳米混悬液粒径等理化性质的影响, 获得了活性保存良好且易溶于水的 LP-98 纳米混悬液冻干粉。

### 2 实验

#### 2.1 材料与试剂

两亲性脂肽 LP-98(中国医学科学院病原生物学研

究所),十二烷基硫酸钠(SDS)、泊洛沙姆 188(P188)、聚乙烯吡咯烷酮-K30(PVP K30)、泊洛沙姆 127(F127)、羧甲基纤维素钠(CMC)均购于国药集团化学试剂有限公司,乙腈(ACN, Thermo Fisher, 色谱纯),三氟乙酸(TFA, Thermo Fisher, 色谱纯),屈臣氏饮用水(蒸馏制法,广州屈臣氏食品饮料有限公司),铝箔(广州家亮化工有限公司)。

## 2.2 实验设备与分析仪器

LA310s 精密电子天平(METTLER TOLEDO 公司),EURO-STDS25 搅拌器(IKA 公司),T18 均质机(IKA 公司),超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,SB25-12DTD),110EH-0536 高压微射流均质机(WESTWOOD 公司),JEM-6700F 扫描电子显微镜(JEOL 公司),Jasco 810 圆二色谱仪(JASCO 公司),zetasizer nanoZS 动态光散射粒度仪(Malvern 公司),离心机(上海托莫斯科学仪器有限公司),优普系列纯水机(UPH-IV-20TNP),高效液相色谱仪(HPLC, Shimadzu, LC-20AT),真空冷冻干燥机(Labconco)。

## 2.3 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,2 月龄,体质量为  $200 \pm 20$  g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 LP-98 纳米混悬液的制备

称取一定量的 SDS 加入超纯水,配置成稳定剂溶液。再称取一定量的 LP-98 粉末,置于稳定剂溶液中,超声预处理。使用桨式搅拌器将药物和稳定剂均匀混合,再使用 T18 均质机进行分散预处理,初步降低混悬液中药物颗粒粒径,防止堵塞高压均质机;最后将预处理的料液倒入高压均质机,调整压力和循环次数,高压均质制备得到 LP-98 的纳米混悬液<sup>[25,26]</sup>。

### 2.4.2 LP-98 纳米混悬液冻干粉的制备

首先将 LP-98 纳米混悬液(LP-98 NS)-20℃预冻成固体形态,然后使用真空冷冻干燥机冻干,3 天后收集样品粉末,得到 LP-98 纳米混悬液冻干粉(LP-98 NSLP)。

### 2.4.3 粒径、PDI 及 Zeta 电位测定

取适量的 LP-98 纳米混悬液,用超纯水稀释到适当浓度;取适量冻干粉,使用超纯水复溶后使用马尔文动态光散射粒度仪检测粒径、PDI 与 Zeta 电位。

### 2.4.4 表面形貌观察

分别取 LP-98 原料药和 LP-98 纳米混悬液冻干粉样品适量,加入超纯水并将其混匀,将样品滴在铝箔上,均匀摊开,自然晾干。将粘有样品的铝箔剪下适量面积

并用导电胶贴于样品台,在真空条件下喷金 1 次,条件为 10 mA、120 s,用 SEM 观察。

### 2.4.5 圆二色光谱分析

使用圆二色光谱仪分别测定 LP-98 溶液,LP-98 纳米混悬剂,对比圆二色光谱图判断制备过程对 LP-98 二级结构的影响。测试条件:样品浓度 0.1~0.2 mg/mL,扫描范围 190~260 nm,扫描次数 3 次,扫描速度 1 nm/s。

### 2.4.6 溶解度测定

(1) 色谱条件:安捷伦 C18(250×4.6 mm),流动相 A 为含 0.05vol% TFA 的水溶液,流动相 B 为含 0.05vol% TFA 的乙腈,流速 1 mL/min,检测波长 220 nm,柱温 25℃,进样量 20 μL,梯度洗脱方法见表 1。

(2) LP-98 原料药及其纳米混悬液冻干粉末溶解度检测。称取过量的 LP-98 原料药与 LP-98 冻干粉各 50 mg,分别置于锥形瓶中,加入 20 mL 的水,充分震荡后,将锥形瓶置于恒温摇床,设置摇床温度为 37℃,速度为 100 r/min,持续振摇 20 h 后取上清液 3 mL,将取出的液体置于离心管中,以 8000 r/min 的速度离心 10 min 后,取上清液过 0.45 μm 滤膜,取续滤液进行适当稀释后使用上述色谱条件进样分析。

表 1 HPLC 梯度洗脱方法  
Table 1 Gradient elution method of HPLC

Time/min	Concentration of B/%
0.01	40
20.01	100
25.01	100
26.01	40
35.00	40
35.01	Stop

### 2.4.7 生物活性检测

为确定制备工艺对 LP-98 生物活性的影响,分别将 3 批 LP-98 纳米混悬液冻干粉进行细胞抗病毒活性检测。采用单周期病毒感染实验:将病毒分子克隆转染到 HEK293T 细胞中制备病毒原种。将 50 μL 药物溶液、50 μL 病毒溶液及 100 μL TZM-bl 细胞共孵育,感染后 2 天收获细胞,并在报告裂解缓冲液中裂解,并测量荧光素酶活性<sup>[12]</sup>。

### 2.4.8 药代动力学研究

(1) 取 18 只健康的 SD 雄性大鼠随机分为生理盐水组、LP-98 原料药组与 LP-98 纳米混悬液冻干粉组,每组 6 只。分别单次皮下注射生理盐水,1.2 mg/mL LP-98 原料药及含 LP-98 量为 0.6 mg/mL 的纳米混悬液冻干粉,注射体积均为 1 mL,其中粉状药物均用生理盐水作

为溶剂。注射完成后的 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 100, 168 h 自眼眶取血, 测定大鼠血清中的药物质量浓度。

(2) 相对生物利用度计算。生物利用度 (Bioavailability) 是指用药后, 药物被吸收进入体循环的速度与程度, 可分为绝对生物利用度和相对生物利用度。相对生物利用度是以其他非静脉途径给药的制剂为参比制剂, 是同一种药物不同剂型之间或不同制剂之间比较药物吸收进入体循环的相对量, 计算公式如下:

$$F_r(\%) = \frac{AUC_r / \text{Dose}_r}{AUC_R / \text{Dose}_R} \quad (1)$$

其中,  $F_r$  为相对利用度,  $r$  代表供试品,  $R$  代表对照品,  $\text{Dose}$  代表用药剂量。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 LP-98 纳米混悬液的制备的影响因素

##### 3.1.1 稳定剂种类的筛选

制备纳米混悬液通常需要加入 PVP K30, P188, F127, CMC, SDS 中的一种或多种作为稳定剂来提高纳米混悬液的稳定性<sup>[23]</sup>, 本研究分别以上述材料作为稳定剂, 制备 LP-98 纳米混悬液。LP-98 作为一种 HIV 膜融合抑制剂, 通过阻止病毒膜融合过程, 将病毒阻断在细胞外部<sup>[14]</sup>。其主要功能区位于 LP-98 的多肽段, 通过比较 LP-98 原料药与 LP-98 纳米混悬液的 CD 谱图, 可以验证多肽端结构是否发生改变。稳定剂对药物结构的影

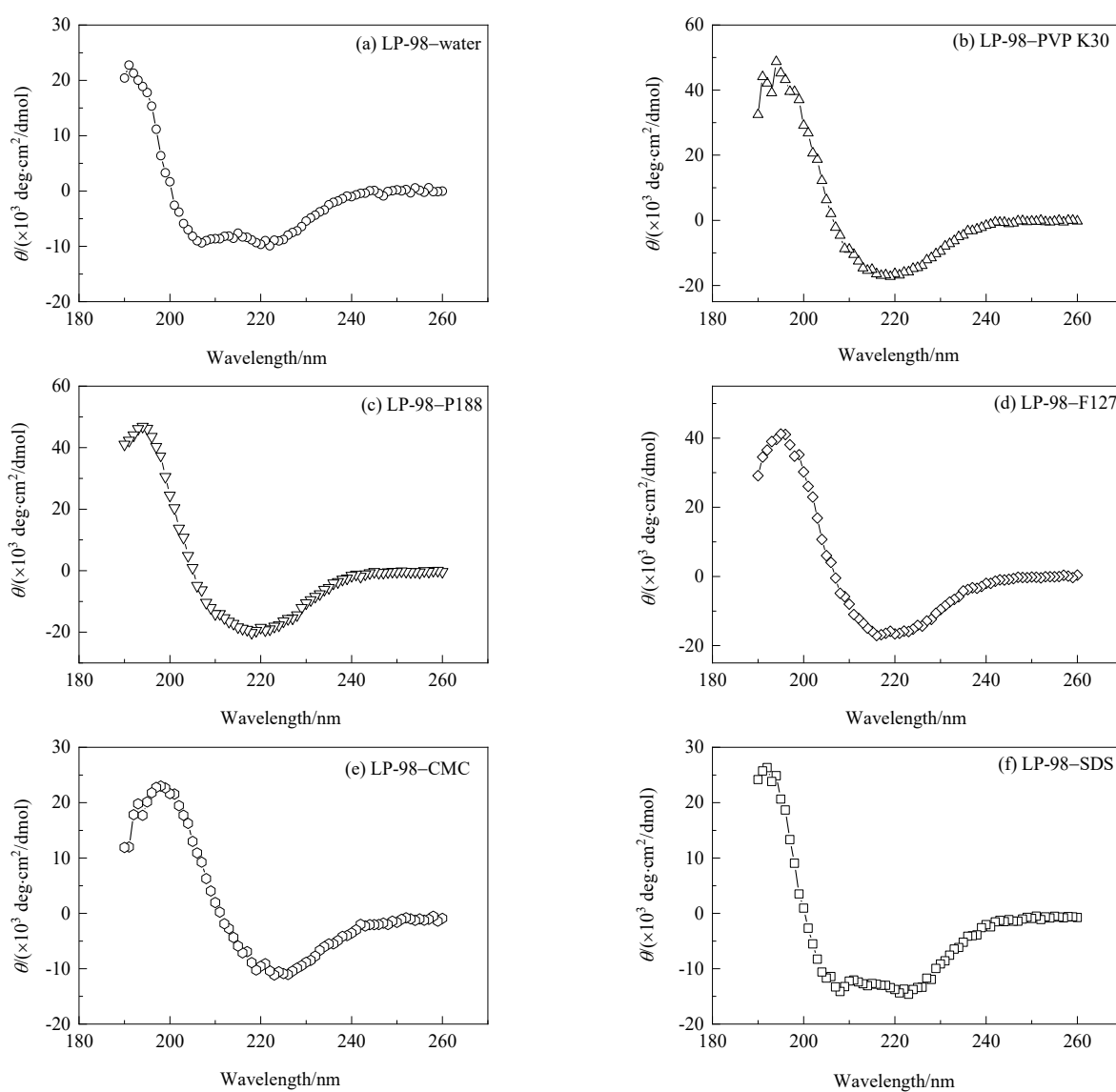


图1 稳定剂对 LP-98 二级结构的影响  
Fig.1 Effect of stabilizer on the secondary structure of LP-98

响较大，因此以 LP-98 二级结构为筛选条件，确定稳定剂种类，结果见图 1。

由图 1(a)可见,LP-98 水溶液的 CD 图谱在 200~220 nm 处有结构峰，表明此区间内多肽具有特定的二级结构，从而发挥其功能性。而溶解于 PVPK30,F127,P188,CMC 中的 LP-98 CD 谱图显示，200~220 nm 范围内的结构峰消失。可推断这四个稳定剂对 LP-98 的功能结构造成了一定的影响。原因是这四个稳定剂均为非离子型稳定剂，主要靠吸附于药物表面，提供空间位阻维持药物制剂的稳定。两亲性脂肽药物 LP-98 的功能区为多肽链，当稳定剂吸附在多肽段时，阻挡或直接掩盖了 LP-98 的活性中心，使其二级结构发生变化。而 SDS 为离子型稳定剂，通过疏水作用与脂肪链端结合，通过提供静电排斥力维持体系的稳定，不会影响多肽段的二级结构[图 1(f)]，溶解于 SDS 中的 LP-98 CD 图谱与原料药在 200~220 nm 段的结构峰位置一致，表明 SDS 并未对 LP-98 的二级结构造成影响，因此选定 SDS 为稳定剂进行后续研究。

3.1.2 稳定剂浓度对粒径和 Zeta 电位的影响

稳定剂浓度会影响纳米混悬液粒径及稳定性，且单独使用离子型稳定剂，维持体系稳定需要体系 Zeta 电位达±30 mV<sup>[28]</sup>，从而提供足够的静电排斥力，使纳米颗粒不发生聚集。以粒径和 Zeta 电位为评价指标，考察不同浓度稳定剂对 LP-98 纳米混悬液性质的影响，结果见表 2。随稳定剂浓度增加，药物粒径逐渐减小，当浓度达到 0.50wt%时，粒径不再有较大变化，这是由于药物浓度一定，溶液中的药物分子数量一定，当足够的 SDS 包裹在 LP-98 分子表面时，LP-98 纳米粒子的粒径不再随稳

定剂浓度增加而变化。LP-98 纳米混悬液的 Zeta 电位随着稳定剂浓度的增加而持续减小，这是由于 SDS 浓度越高，提供的负电荷越大，从而使 Zeta 电位值越小，当 SDS 浓度增加到 0.80wt%时，体系 Zeta 电位达到了-30 mV，可以维持体系稳定，颗粒粒径也较小。综合考虑实际应用中辅料的安全用量和限度，不考虑更高浓度的稳定剂，选择 SDS 浓度为 0.80wt%。

表 2 稳定剂浓度对 LP-98 纳米混悬液粒径和 Zeta 电位的影响

Concentration of SDS/wt%	Size/nm	PDI	Zeta/mV
0.08	728.8±9.2	0.593±0.021	-8.36±0.13
0.15	433.1±3.1	0.325±0.010	-14.1±0.3
0.30	387.1±0.6	0.290±0.006	-18.5±0.4
0.50	272.6±2.2	0.243±0.003	-23.5±0.3
0.80	266.0±0.8	0.235±0.004	-31.8±0.3
1.0	254.4±1.1	0.222±0.005	-43.1±0.7

3.1.3 高压均质压力及循环次数的筛选

高压均质压力和循环次数对纳米混悬液的粒径及粒径分布有较大影响<sup>[26]</sup>。多分散系数 PDI 可以衡量粒径分布，一般 PDI=0.10~0.25 时表明纳米混悬剂粒径分布窄，大于 0.5 时表明粒径分布广。较广的粒径分布导致小颗粒容易聚集成大颗粒，纳米混悬液体系不稳定<sup>[28]</sup>，因此纳米混悬液 PDI 应控制在 0.10~0.25。确定稳定剂 SDS 浓度为 0.80wt%后，对高压均质压力和循环次数进行考察，结果如图 2 所示。

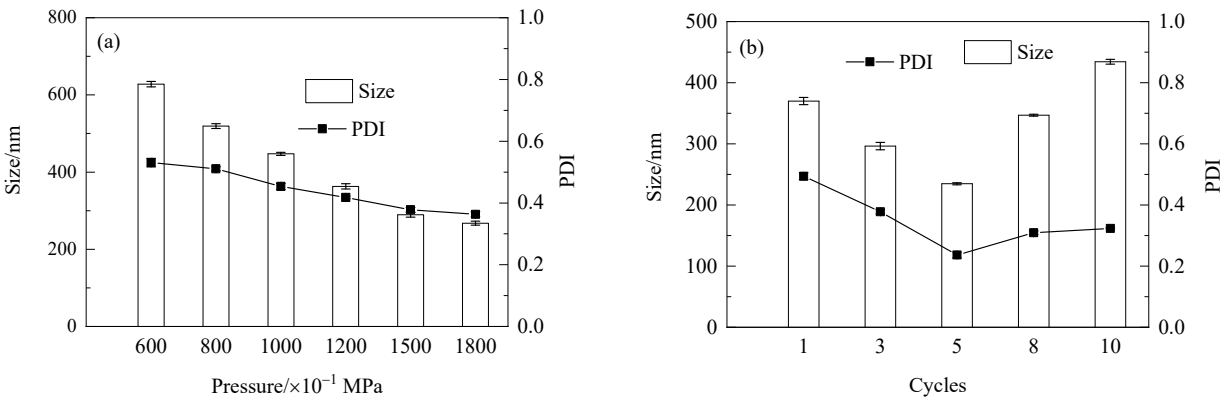


图 2 高压均质压力与高压均质循环次数对 LP-98 纳米混悬液性质的影响  
Fig.2 Effects of high-pressure homogenization pressure and number of high-pressure homogenization cycles on the properties of LP-98 NS

由图2可见,随高压均质压力增大,LP-98纳米混悬液的粒径明显降低;当均质压力大于150 MPa时,粒径随压力增大变化不明显。在高压均质压力一定的情况下,随循环次数增加,LP-98纳米混悬液的粒径明显降低;当循环次数大于5次时,循环次数增加,粒径反而增大,原因是循环次数过多,在均质过程中纳米颗粒积蓄较大的能量,再次发生碰撞时,容易聚集成大的颗粒,稳定性降低。综合考虑高压均质压力和循环次数对LP-98纳米混悬液性质的影响及能耗,确定高压均质压力为150 MPa,循环次数为5次。此工艺条件下,纳米混悬液PDI为0.229,小于0.25,颗粒分散性良好<sup>[28]</sup>。

通过考察稳定剂种类、稳定剂浓度、高压均质压力与循环次数对纳米混悬液理化性质的影响,确定最终制备工艺:稳定剂SDS浓度为0.80wt%,高压均质压力为150 MPa,循环次数为5次,制备获得平均粒径为 $237.6 \pm 0.6$  nm, Zeta 电位为 $-31.7 \pm 0.6$  mV, PDI 为0.229的LP-98纳米混悬液。

### 3.2 冻干对粒径及 Zeta 电位的影响

纳米混悬液处于热力学不稳定状态,保存条件苛刻,保存时间也较短。相对于纳米混悬液,冻干粉末的储存及使用更方便,本研究对制备得到的LP-98纳米混悬液进行冻干处理。为考察冻干过程是否对纳米混悬液颗粒产生影响,造成颗粒黏连,复溶后混悬性变差,首先对LP-98纳米混悬液冻干粉复溶液的粒径及Zeta电位进行表征,并与LP-98纳米混悬液对比。LP-98纳米混悬液冻干粉复溶液呈现无色透明状,平均粒径为 $261.5 \pm 1.1$  nm, Zeta 电位为 $-31.5 \pm 0.2$  mV,这与冻干前颗粒平均粒径 $237.6 \pm 0.6$  nm, Zeta 电位 $-31.7 \pm 0.6$  mV相比,粒径和电位均无较大变化(图3)。

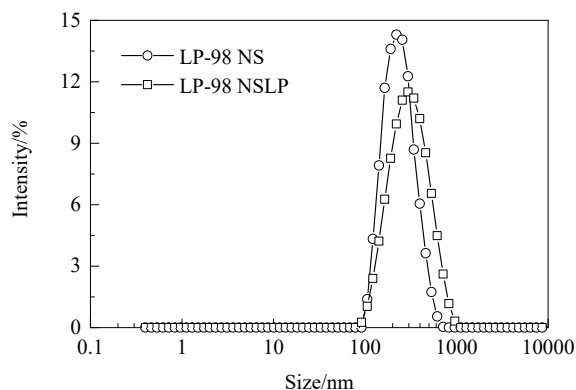


图3 LP-98纳米混悬液及其冻干粉复溶后的粒径分布  
Fig.3 Particle size distributions of LP-98 NS and LP-98 NSLP

### 3.3 LP-98 二级结构的鉴定

为考察高压均质及冻干过程对LP-98纳米混悬液冻干粉中药物结构的影响,使用圆二色谱法对LP-98二级结构进行鉴定。脂肽LP-98在200~220 nm出现明显的结构峰<sup>[7]</sup>。使用圆二色谱法对LP-98原料药与LP-98纳米混悬液冻干粉进行分析,发现冻干粉中的LP-98结构峰与LP-98原料药结构峰峰型及出峰位置一致,表明LP-98纳米混悬液冻干粉中的药物结构未发生改变。

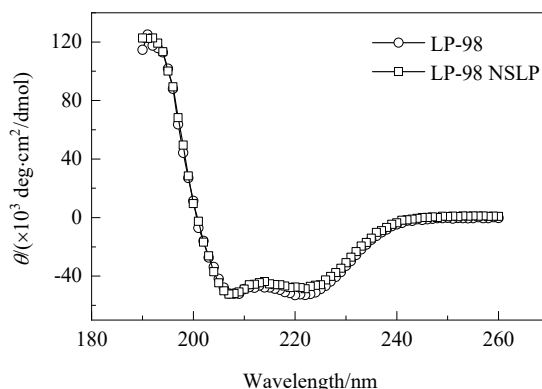
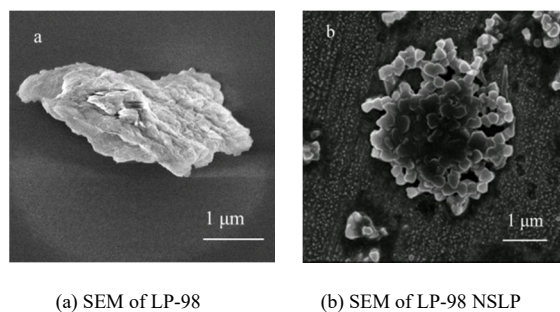


图4 LP-98原料药与LP-98纳米混悬液冻干粉圆二色谱图  
Fig.4 CD patterns of LP-98 and LP-98 NSLP

### 3.4 溶解度的检测

LP-98 NS在水中的溶解度约为1733  $\mu\text{g/mL}$ ,与原料药(溶解度为184  $\mu\text{g/mL}$ )相比,提高了约8倍。药物颗粒的溶解度与颗粒粒径密切相关,颗粒粒径越小,比表面积增加,药物与溶剂的接触面增大,溶解性更好。电镜图(图5)显示,LP-98原料药粒径约为4~6  $\mu\text{m}$ ,LP-98纳米混悬液冻干粉形态呈不规则颗粒状,粒径约为200~400 nm,与动态光散射粒度仪测量结果基本一致。表明在高压均质处理后,药物颗粒由微米级降至纳米级,增大颗粒与溶剂的接触面积,提高药物溶解性。



(a) SEM of LP-98 (b) SEM of LP-98 NSLP  
图5 LP-98原料药与LP-98纳米混悬液冻干粉扫描电镜图  
Fig.5 SEM images of LP-98 and LP-98 NSLP

3.5 生物抗病毒活性鉴定

半抑制浓度(Half Maximal Inhibitory Concentration, IC50)是指抑制半数病毒活性时, 药物的浓度, IC50 越小, 表明抗病毒活性越高。原料药的 IC50 约为 1~2 pM<sup>[11]</sup>, 由表 3 可知, 相同实验条件下, 三个不同批次的 LP-98 纳米混悬液冻干粉的 IC50 值与原料药接近且略低, 表明原料药的生物活性未被破坏。对三组数据进行显著性分析,  $P>0.05$ , 表明三组数据间无显著性差异, 表明高压均质制备得到的 LP-98 纳米混悬液冻干粉的生物活性制备过程中未受到破坏, 且批次间差异小。

表 3 LP-98 纳米混悬液冻干粉抗病毒活性(n=3)	
Table 3 Antiviral activity of LP-98 NSLP (n=3)	
Sample	IC50 (pM)
LP-98 NSLP-1	0.77±0.14
LP-98 NSLP-2	0.63±0.2
LP-98 NSLP-3	0.79±0.24

3.6 药代动力学

皮下注射 LP-98 和 LP-98 NSLP 后药时曲线见图 6, 用 DAS3.1.1 软件非房室模型计算 SD 大鼠给药后的相关药代动力学参数见表 4。

DAS 软件模拟得到的药代动力学参数可以发现(表 4), 原料药和 LP-98 纳米混悬液冻干粉在大鼠体内的半衰期均在约 12 h, 同时可发现两种形式的 LP-98 药物在生物体内代谢达到最高血药浓度所需时间也相同, 表明制备得到的 LP98 纳米混悬液冻干粉在大鼠体内的代谢行为并未发生改变, 高压均质及稳定剂均未破坏 LP-98 药物代谢特性。

结合表 4, 以 LP-98 原料药为参比, 根据式(1)计算 LP-98 纳米混悬液冻干粉相对生物利用度:

$$F_r(\%) = \frac{1169385.762/0.6}{2384560.55/1.2} \times 100\% = 98.1\%$$

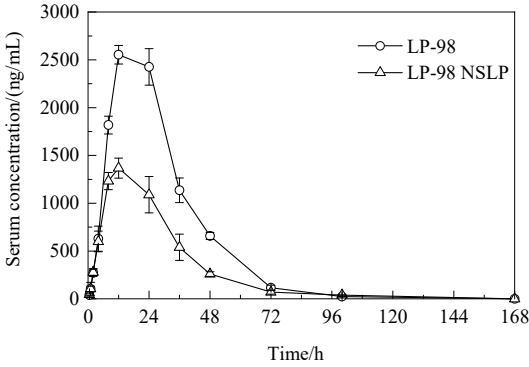


图 6 LP-98 与 LP-98 纳米混悬液冻干粉的血液浓度-时间曲线

Fig.6 Blood concentration-time curves of LP-98 and LP-98 NSLP

表 4 血清中 LP-98 药代动力学参数  
Table 4 Pharmacokinetic parameters of plasma of LP-98 in rats

Parameter	LP-98	LP-98 NSLP
$C_{max}/(ng/mL)$	2533.33	1367
$T_{max}/h$	12	12
$T_{1/2}/h$	11.29	12.37
$AUC_{(0-t)}/(ng \cdot h/mL)$	2341774.76	1138648.458
$AUC_{(0-\infty)}/(ng \cdot h/mL)$	2384560.55	1169385.762

LP-98 纳米混悬液冻干粉生物利用度为原料药的 98.1%, 在相近的生物利用度下, LP-98 纳米混悬液冻干粉具有更高的溶解度, 且不需要氨水溶解, 提高了临床上使用的可能性; 解决了注射过程堵针的问题, 可减轻注射时患者的痛苦。

4 结 论

以艾滋预防药物—两亲性脂肪 LP-98 为研究对象, 采用高压均质技术制备 LP-98 纳米混悬液及冻干粉, 并对其进行物理性质表征、溶解度检测及药代动力学研究, 得到以下结论:

(1) 通过单因素实验, 确定最终工艺条件: 稳定剂 SDS 浓度为 0.80wt%, 高压均质压力为 150 MPa, 循环次数为 5 次。在此条件下制备得到的 LP-98 纳米混悬液平均粒径为 237.6±0.6 nm, Zeta 电位为-31.7±0.6 mV; 对 LP-98 纳米混悬液进行冻干处理后, 冻干粉平均粒径为 261.5±1.1 nm, Zeta 电位为-31.5±0.2 mV, 与冻干前相比无明显变化。

(2) 通过一系列检测, LP-98 纳米混悬液冻干粉的生物利用度为原料药的 98.1%, 且冻干粉中的 LP-98 二级结构和生物活性均未改变。

(3) LP-98 纳米混悬液在水中溶解度由原料药的 184 μg/mL 提高至 1733 μg/mL, 提高了 8 倍, 为 HIV 膜融合抑制剂 LP-98 推向临床使用提供了保证。

参考文献

[1] Mei J, Zhao J. Prediction of HIV-1 and HIV-2 proteins by using Chou's pseudo amino acid compositions and different classifiers [J]. Scientific Reports, 2018, (8): 2359.

[2] 疾病预防控制中心. 2019 年我国艾滋病防治工作取得新进展 [EB/OL](2019-11-30)[2020-4-20]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3586/201911/c2388ce70bdd404ea6dfcd886591784d.shtml>.

[3] Flexner C, Saag M. The antiretroviral drug pipeline: prospects and implications for future treatment research [J]. Current Opinion in HIV and Aids, 2013, 8: 572-578.

[4] Saag M S. New and investigational antiretroviral drugs for HIV infection: mechanisms of action and early research findings [J]. Topics in Antiviral Medicine, 2012, 20: 162-167.



- [5] Zhang D, Li W, Jiang S. Peptide fusion inhibitors targeting the HIV-1 gp41: a patent review (2009–2014) [J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2015, 25: 159–173.
- [6] Chong H H, Wu X Y, Su Y, et al. Development of potent and long-acting HIV-1 fusion inhibitors [J]. AIDS, 2016, 30(8): 1187–1196.
- [7] Chong H H, Qiu Z L, Su Y, et al. Design of a highly potent HIV-1 fusion inhibitor targeting the gp41 pocket [J]. AIDS, 2015, 29(1): 13–21.
- [8] Zhu Y, Zhang X, Ding X, et al. Exceptional potency and structural basis of a T1249-derived lipopeptide fusion inhibitor against HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus [J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(14): 5323–5334.
- [9] Zhu Y, Chong H H, Yu D, et al. Design and characterization of cholesterylated peptide HIV-1/2 fusion inhibitors with extremely potent and long-lasting antiviral activity [J]. Journal of Virology, 2019, 93(11): e02312–18.
- [10] Chong H H, Yao X, Qiu Z L, et al. Short-peptide fusion inhibitors with high potency against wild-type and enfuvirtide-resistant HIV-1 [J]. FASEB Journal, 2013, 27(3): 1203–1213.
- [11] Mcglone R, Bodenham A. Reducing the pain of intradermal lignocaine injection by pH buffering [J]. Archives of Emergency Medicine, 1990, 7: 65–68.
- [12] Lowe P L, Lowe N J. Botulinum toxin type B: pH change reduces injection pain, retains efficacy [J]. Dermatologic Surgery, 2014, 40(12): 1328–1333.
- [13] Simamora P, Pinsuan S, Alvarez J M, et al. Effect of pH on injection phlebitis [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 84: 520–522.
- [14] 张清峰, 聂海纯, 付莹娟, 等. 落新妇苷- $\beta$ -环糊精包结物的溶解性及生物利用度研究 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(5): 82–86.
- [15] Zhang Q F, Nei H C, Fu Y J, et al. Study on the solubility and bioavailability of astilbin- $\beta$ -cyclodextrin inclusions [J]. Modern Food Technology, 2014, 30(5): 82–86.
- [16] Karami Z, Zan J N, Hamidi M, et al. Improved oral bioavailability of repaglinide, a typical BCS class II drug, with a chitosan-coated nanoemulsion [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2020, 108(3): 717–728.
- [17] Chow S F, Chen M, Shi L, et al. Simultaneously improving stability, mechanical properties, and dissolution properties of ibuprofen and flurbiprofen by cocrystallization with nicotinamide [J]. Pharmaceutical Research, 2012, 29: 1854–1865.
- [18] Stanton M K, Bak A. Physicochemical properties of pharmaceutical co-crystals: a case study of ten AMG 517 co-crystals [J]. Crystal Growth & Design, 2008, 8: 3856–3862.
- [19] Liu Y, Xie P C, Zhang D R, et al. A mini review of nanosuspensions development [J]. Journal of Drug Targeting, 2011, 20(3): 209–223.
- [20] Luo Y F, Xu L S, Tao X G, et al. Preparation, characterization, stability and *in vitro-in vivo* evaluation of pellet-layered simvastatin nanosuspensions [J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2013, 39(7): 936–946.
- [21] Singh S K, Vaidya Y, Gulati M, et al. Nanosuspension: principles, perspectives and practices [J]. Current Drug Delivery, 2016, 13(8): 1222–1246.
- [22] Zhang J Y, Shen Z G, Zhong J, et al. Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants [J]. Journal of Pharmaceutics, 2006, 323: 153–160.
- [23] Khan I U, Serra C A, Anton N, et al. Production of nanosuspensions as a tool to improve drug bioavailability: focus on topical delivery [J]. Current Pharmaceutical Design, 2015, 21(42): 6089–6103.
- [24] Ali H S M, York P, Blagden N. Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 375: 107–113.
- [25] Mao S R, Li L C, Zhang X. Nanosuspensions of poorly water soluble drugs prepared by top-down technologies [J]. Current Pharmaceutical Design, 2014, 30(3): 388–407.
- [26] 周时光, 林雯, 陈晨, 等. 格列本脲纳米片的制备及溶出度考察 [J]. 医药导报, 2014, 33(11): 1509–1513.
- [27] Zhou S G, Lin W, Chen C, et al. Preparation and dissolution of glibenclamide nanosheets [J]. Medical Herald, 2014, 33(11): 1509–1513.
- [28] Gao Y, Li Z, Sun M, et al. Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension [J]. Drug Delivery, 2010, 18(2): 131–142.
- [29] Freag M S, Elnaggar Y S R, Abdallah O Y. Development of novel polymer-stabilized diosmin nanosuspensions: *in vitro* appraisal and *ex vivo* permeation [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 454(1): 462–471.
- [30] 陈充抒, 梁艳, 梁莉, 等. 纳米混悬剂的制备、表征及其应用研究进展 [J]. 武警医学, 2013, 24: 358–361.
- [31] Chen C S, Liang Y, Liang L, et al. Research progress on preparation, characterization and application of nanosuspension [J]. Armed Police Medicine, 2013, 24: 358–361.