

静脉给予尿酸酶自组装空心纳米微球的药代动力学和生物等效性初步研究

邓雪, 胡雪原, 何丹, 晏子俊, 周云莉, 张景勃*

(重庆医科大学药学院 / 药物高校工程研究中心, 重庆 400016)

摘要: 研究了载尿酸酶聚乙二醇-透明质酸 (Hyaluronic acid-graft-polyethylene glycol, HA-g-PEG)/磺丁基- β -环糊精 (Sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin, SCD) 自组装空心纳米微球 (HA-g-PEG/SCD self-assembly hollow spheres encapsulated uricase, UHPSD) 在大鼠体内的药代动力学和生物等效性。大鼠单剂量静脉注射给予 UHPSD 和游离尿酸酶 (Uricase, UOX), 眼底静脉丛取血, 测定给药后不同时间点大鼠血浆中尿酸酶的活性。采用 DAS 2.1.1 软件分析处理药动学数据, 并对 UHPSD 和 UOX 进行生物等效性评价。UHPSD 和 UOX 血药活性曲线符合二室模型。UHPSD 提高了尿酸酶的生物利用度, UHPSD 与 UOX 不具有生物等效性。

关键词: 尿酸酶; 自组装空心纳米微球; 药代动力学; 生物等效性

中图分类号: R 91 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)07-0698-04

Pharmacokinetics and Bioequivalability of Intravenous Uricase Self-Assembly Hollow Nanospheres

DENG Xue, HU Xueyuan, HE Dan, YAN Zijun, ZHOU Yunli, ZHANG Jingqing*

(College of Pharmacy / Engineering Research Center in University, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: To study the pharmacokinetic and bioequivalence of hollow nanospheres self-assembled by hyaluronic acid-graft-poly (ethylene glycol) (HA-g-PEG) and sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin (SCD) containing uricase (UHPSD) in SD rats. Rats were administrated with (i.v.) UHPSD and UOX, respectively. Blood sample were collected from eye socket, and the activity of uricase were assayed. Compartmental pharmacokinetics were analyzed by DAS 2.1.1 software, then the bioequivalence was judged. The activity-time curve of UHPSD and UOX were conformed to a two-compartment model with a lag time.

Keywords: uricase, self-assembly hollow nanosphere, pharmacokinetics, bioequivalability

尿酸酶 (Uricase, UOX) 是生物体内嘌呤代谢途径中的关键酶, 能够专一催化尿酸氧化生成尿囊

素、过氧化氢和二氧化碳^[1-2], 降低体内尿酸水平。人类和灵长类动物缺乏 UOX, 故可将其用于尿结石和

收稿日期: 2015-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30973645); 重庆市首批高等学校优秀人才资助计划。

* 通信作者: 张景勃 (1973—), 女, 重庆人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物新剂型与新技术研究工作。E-mail: zjqrae01@163.com

引用本文: 邓雪, 胡雪原, 何丹, 等. 静脉给予尿酸酶自组装空心纳米微球的药代动力学和生物等效性初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(07): 698-701.

肾病功能衰竭等所致高尿酸血症的治疗^[3]。如 Patte 等^[4]用从黄曲霉中制备的 UOX 治疗由白血病化疗引起的严重高尿酸血症。但是天然的 UOX 存在许多缺点:生理 pH 条件下活性低,稳定性差,体内活性半衰期短,机体易产生免疫反应以及易被体内酶水解失活^[5]。因此,UOX 的临床应用受到较大限制。

自组装空心纳米微球是一种新型的药物载体,具有生物膜相似性,提高被包封药物的稳定性,降低免疫原性和提高药物生物利用度等优点^[6]。为了克服 UOX 的缺点,将 UOX 装载于聚乙二醇-透明质酸(Hyaluronic acid-graft-poly ethylene glycol, HA-g-PEG)/磺丁基-β-环糊精(Sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin, SCD)形成的空心纳米微球中,形成尿酸酶自组装空心纳米微球(HA-g-PEG/SCD self-assembly hollow spheres encapsulated uricase, UHPSD)。作者着重考察了 UHPSD 在大鼠体内的药动学过程,并对 UHPSD 和 UOX 进行生物等效性评价,为进一步研究 UHPSD 的药效提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

UOX,美国 Sigma 公司产品;尿酸,英国 Alfa Aesar 公司产品;磺丁基-β-环糊精:南京都莱生物技术有限公司产品。

AB204S 电子分析天平:瑞士 Mettler Toledo 仪器公司产品;85-2 型恒温磁力搅拌器:上海司乐仪器有限公司产品;TGL-16B 台式高速离心机:上海安亭科学仪器厂产品;UV-7504 PC 型紫外分光光度计,PHS-3C 型 pH 计:上海精密科学仪器有限公司产品;Sephadex G-200 层析柱:上海楷洋生物技术有限公司产品;清洁级 SD 大鼠:雄性,(230±20)g,中国人民解放军第三军医大学动物中心提供,动物合格证书:SCXK(渝)2012-0005。

1.2 试验方法

1.2.1 UHPSD 的制备 按照 Meng 等^[7]的方法,将 1 mg 的 UOX 溶于 2 mL 的 HA-g-PEG 溶液(质量分数 1.0%)中,然后在搅拌的条件下,将 2 mL 含有 UOX 的 HA-g-PEG 溶液缓慢滴加入 6 mL 的 SCD 溶液(质量分数 6.0%)中。开始滴加时,溶液变轻微的浑浊,表明开始有空心纳米球形成。继续在 10℃条件下磁力搅拌 2 h,即得 UHPSD。

1.2.2 UHPSD 包封率的测定 按照参考文献报道

方法,采用葡聚糖凝胶柱色谱法^[8]测定包封率。待 Sephadex G-200 柱填充与平衡后,吸取 0.5 mL 的 UHPSD,上柱,用 pH8.5 的 Bicine-NaOH 缓冲液作为洗脱液洗脱分离 UHPSD 和 UOX。取 100 μL 过柱后的 UHPSD,加入乙醚破乳后,再加入考马斯亮蓝,在 595 nm 波长处测定吸收度值(A_1)。以同法处理的未过柱的 UHPSD,同法测定吸收度值(A_2)。包封率(%)= $(A_1/A_2) \times 100\%$,重复 3 次。

1.2.3 动物分组及给药 取雄性 SD 大鼠 12 只,按照简单随机方法分为 2 组,每组 6 只。一组静脉注射给予 UOX (2U/Kg),另一组静脉给予 UHPSD (相当于游离酶 2U/Kg)。给药前禁食不禁水 24 h,分别在给药后 0.083、0.17、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、24 h 后,眼眶下静脉取血,置于肝素化离心管中,离心(6 000 r/min)10 min 后分离血浆样品。

1.2.4 药时曲线的绘制 按照采用直接动力学尿酸酶法^[9]测定 UHPSD 组和 UOX 组大鼠不同采血时间点血浆样品中酶的活性。根据所测结果,以时间为横坐标,酶活性为纵坐标,绘制平均血药活性-时间曲线。

1.2.5 药动学和生物等效性分析 用药代动力学计算程序 DAS 2.1.1 拟合大鼠单次静脉注射 UHPSD 和 UOX 的经时血药浓度数据, C_{max} 及 T_{max} 采用实测值, $AUC_{0-24 h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 和半衰期 $t_{1/2}$ 为拟合数据。根据 $AUC_{0-24 h}$ 计算 UHPSD 的平均相对生物利用度,即:平均相对生物利用度(F)= $AUC(UHPSD)/AUC(UOX)$ 。再采用双向单侧 t 检验的统计量,求得 $(1-2\alpha)$ 置信区间。如在规定范围内(经对数转换后,UHPSD 的 $AUC_{0-24 h}$ 在 UOX 的 80%~125% 范围,UHPSD 的 C_{max} 在 UOX 的 70%~143% 范围),即可有 $1-2\alpha$ 判断两者生物等效。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 UHPSD 的包封率

制备 3 批 UHPSD,经检测,平均包封率为 $(62.60 \pm 3.17)\%$ 。

2.2 药时曲线和药动学

2 组雄性 SD 大鼠分别静脉注射 UHPSD 和 UOX 后,尿酸酶的药-时曲线见图 1。UHPSD 和 UOX 在 SD 大鼠体内的药代动力学参数见表 1。

如图 1 所示,SD 大鼠分别静脉注射 UHPSD 和 UOX 后,UOX 组酶活性达到最高值后迅速下降。2 h

时,UOX 组大鼠血浆样品中检测不出酶的活性,而此时,UHPSD 组大鼠血浆样品仍保留较高的酶活性(40.87 mU/L)。到达 10 h 时,UHPSD 组大鼠血浆样品仍然能够检测到酶活性,且此时酶活性为本组最高活性的 12.35%。实验结果表明,UHPSD 延长了 UOX 在大鼠体内的滞留时间。

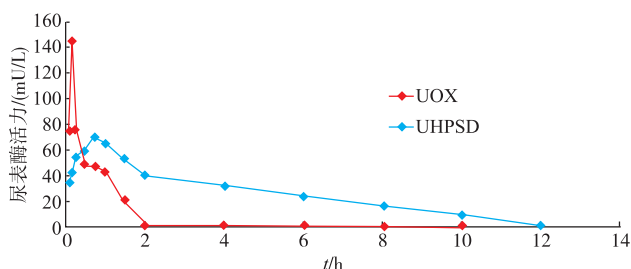


图 1 SD 大鼠静脉注射 UHPSD 和 UOX 后平均血药浓度-时间曲线

Fig. 1 Mean plasma concentration-time curve after injecting UHPSD and UOX in SD rats

表 1 SD 大鼠静脉注射 UHPSD 和 UOX 后的主要药动学参数

Table 1 Main pharmacokinetic parameters after injecting UHPSD and UOX in rats

类别	$AUC_{(0-24h)}$ (mU·h/L)	$AUC_{(0-\infty)}$ (mU·h/L)	C_{max} /(mU/L)	T_{max} /h	$t_{1/2}$ /h
UHPSD	412.25 ± 34.87	526.71 ± 115.90	73.91 ± 3.93	0.97 ± 0.30	0.89 ± 0.25
UOX	116.04 ± 6.61	146.87 ± 23.93	145.22 ± 6.10	0.33 ± 0.00	8.35 ± 5.95

和 C_{max} 具有显著性差异 ($P < 0.05$), T_{max} 经非参数秩和检验具有显著性差异 ($P < 0.05$)。按照生物等效性判定标准, 单次静脉注射 UHPSD 和 UOX 比较, 两者不具有生物等效性。

3 结 语

针对 UOX 存在生理 pH 条件下活性低; 稳定性差, 体内活性半衰期短; 机体易产生免疫反应以及易被体内酶水解失活等缺点。Poznansky^[10] 等将尿酸酶与白蛋白进行交联; Yasuda^[11] 将尿酸酶吸附或以共价结合于壳聚糖或葡聚糖等。但是, 以上方法都不能使尿酸酶发挥其最佳的催化活性, 且大都存在生物相容性较低以及稳定性不理想等缺点。自组装

如表 1 所示, UHPSD 组和 UOX 组的 $t_{1/2}$ 分别为 (8.35 ± 5.95) h 和 (0.89 ± 0.25) h, $t_{1/2}$ 延长了约 8.38 倍。 T_{max} 分别为 (0.97 ± 0.30) h 和 (0.33 ± 0.00) h, T_{max} 明显延后。 AUC_{0-24h} 分别为 (412.25 ± 34.87) mU·h/L 和 (116.04 ± 6.61) mU·h/L, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (526.71 ± 115.90) mU·h/L 和 (146.87 ± 23.93) mU·h/L。经计算, UHPSD 平均相对生物利用度 F_{0-1} 为 (355.27 ± 30.05)%, UHPSD 提高了 UOX 的相对生物利用度。

2.3 生物等效性评价结果

经过 DAS2.1.1 软件处理, AUC_{0-24h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 经对数转换后进行双单侧 t 检验及 90% 可信区间考察, UHPSD 和 UOX 的 AUC_{0-24h} 之比为 355.27%, 置信区间为 78.5%~81.2%; $AUC_{0-\infty}$ 之比为 358.62%, 置信区间为 76.4%~79.4%; C_{max} 之比为 50.90%, 置信区间为 104.3%~107.6%。双向单侧 t 检验结果显示 UHPSD 与 UOX 的 AUC_{0-24h} 、 $AUC_{0-\infty}$

空心纳米微球是一种新型的药物载体, 具有缓释、降低药物毒性、提高药物稳定性等优点。经前期初步研究, 将 UOX 包裹于 HA-g-PEG/SCD 自组装形成的空心纳米微球后, 酶的体外稳定性获得了提高。

目前尚未见 UHPSD 的药物代谢动力学和生物等效性研究的相关报道。作者将 UOX 制备成 UHPSD, 酶以分子形式包裹于纳米微球中, 不会泄露到体液中, 从而到达长效、高效的目的。作者首次对 UHPSD 在大鼠体内的药代动力学和生物等效性进行了初步研究。结果表明 UHPSD 提高了酶的活性和生物利用度, 延长了酶的 $t_{1/2}$ 和 T_{max} , 缓释效果明显。UHPSD 与 UOX 不具有生物等效性。

参考文献:

- [1] FREITAS D S, SPENCER P J, VASSAO R C, et al. Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase[J]. *Int J Pharm*, 2010, 387(1-2): 215-222.
- [2] ZHAO Ming, HE Zhongjie, WANG Rui, et al. Study on fermentation and preparation of recombinant uricase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2015, 34(3): 311-315. (in Chinese)
- [3] JAIN S K, JAIN R K, CHOURASIA M K, et al. Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for

- controlled systemic delivery of acyclovir sodium[J]. **AAPS Pharm Sci Tech**, 2005, 20; 6(1): 35-41.
- [4] PATTE C, SAKIROGLU O, SOMMELET D. European experience in the treatment of hyperuricemia [J]. **Semin Hematol**, 2001, 38(4): 9-12.
- [5] ZHANG Mi, YANG Lin, ZHOU Yunli, et al. Preliminary study on the stability of urate oxidase loaded in lipid nanoparticle[J]. **Journal of Chongqing Medical University**, 2014, 39(10): 1452-1455. (in Chinese)
- [6] HA Wei, MENG Xianwei, LI Quan, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation [J]. **Soft Matter**, 2010, 6(7): 1405-1408.
- [7] MENG X W, HA W, CHENG C, et al. Hollow nanospheres based on the self-assembly of alginate-graft-poly (ethylene glycol) and α -Cyclodextrin[J]. **Langmuir**, 2011, 27(23): 14401-14407.
- [8] WANG Na, ZHAO Chunjing, HUANG Kaishun, et al. Preparation and pharmacodynamics of lipid nanoparticles containing uricase from *Candida utilis*[J]. **International Journal of Biologicals**, 2013, 26(8): 1147-1149. (in Chinese)
- [9] CATHY Vaughan. Development and implementation of a process to ensure safe use of morphine sulfate extended-release liposome injection[J]. **Am J Health-Syst Pharm**, 2008, 65: 458-461.
- [10] POZNANSKY M J. In vitro and in vivo activity of soluble cross-linked uricasealbumin polymers; a model for enzyme therapy[J]. **Life Sci**, 1979, 24: 153-158.
- [11] YASUDA Y, FUJITA T, TAKAKURA Y, et al. Biochemical and Biopharmaceutical properties of macromolecular conjugates of uricase with dextran and polyethylene glycol[J]. **Chem Pharm Bull**, 1990, 38: 2053-2056.

会 议 消 息

会议名称(中文): 2017 年全国植物生物学大会

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学、细胞生物学、遗传与发育生物学、作物学及林木育种、生物学

开始日期: 2017-10-09 结束日期: 2017-10-10

所在城市: 重庆市 渝中区

具体地点: 重庆市 悦来国际会议中心

主办单位: 中国细胞生物学学会、中国作物学会、中国植物学会、中国植物生理与植物分子生物学学会、中国遗传学会

协办单位: 重庆大学、重庆市科协

承办单位: 西南大学、重庆市植物学会、重庆市遗传学会、重庆市作物学会、中国科学院植物分子生理学重点实验室

主题: 植物科学改善人类生活

会议主席: 李家洋、许智宏、袁隆平

联系人: 崔强

联系电话: 010-62836674

E-MAIL: cuiqiang@ibcas.ac.cn

会议网站: <http://www.ncpb.net/2017/>

会议背景介绍: 为了展示我国植物生物学研究的最新成果和进展, 促进植物科学改善人类生活, 加强相关领域科研人员之间的交流与合作, 中国细胞生物学学会、中国作物学会、中国植物学会、中国植物生理与植物分子生物学学会、中国遗传学会联合举办“2017 年全国植物生物学大会”。大会定于 2017 年 10 月 9 日-10 日在重庆市召开。大会将邀请国内植物生物学相关领域取得突出成果并具有重要学术影响的专家学者以及优秀青年科学家进行学术报告。组委会诚挚邀请国内外同行参加本次大会。