

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.06.0690

载天冬酰胺酶自组装纳米囊的药动学及生物等效性

谢江川, 胡雪原, 晏子俊, 周云莉, 张景劼*

重庆医科大学药物高校工程研究中心, 重庆 400016

[摘要] **目的** 研究载天冬酰胺酶(Asp)自组装透明质酸-聚乙二醇(HA-g-PEG)/二甲基-β-环糊精(DCD)纳米囊(AHDPs)在雄性SD大鼠体内的药代动力学和生物等效性。**方法** 考察了AHDPs的透射电镜、粒径、zeta电位、包封率,并分别测定大鼠静脉给予AHDPs和游离Asp后,不同时间点大鼠血浆样品中Asp的活性。采用DAS 2.1.1软件计算药动学参数,对AHDPs和游离Asp进行生物等效性评价。**结果** AHDPs的平均粒径为(439.63±8.49) nm, zeta电位为(-20.43±2.20) mV,平均包封率为(55.75±4.11)% (n=3)。AHDPs和游离Asp的主要药动学参数AUC_{0-48 h}分别为(138.93±0.89) U·mL⁻¹·h和(46.38±1.98) U·mL⁻¹·h, AUC_{0-∞}分别为(175.22±13.59) U·mL⁻¹·h和(51.44±3.01) U·mL⁻¹·h, t_{1/2}分别为(4.46±1.04) h和(1.86±0.38) h。与游离Asp比较, AHDPs的AUC_{0-48 h}、AUC_{0-∞}和t_{1/2}分别提高至约游离Asp的3.00、3.40和2.40倍。AUC_{0-48 h}、AUC_{0-∞}和C_{max}的90%置信区间分别为76.9%~78.3%、76.9%~78.3%、92.8%~94.4%。**结论** AHDPs延长了Asp在大鼠体内的生物半衰期,提高了Asp在大鼠体内的生物利用度,且AHDPs与游离Asp不具有生物等效性。

[关键词] 天冬酰胺酶; 纳米囊; 药代动力学; 生物等效性

[中图分类号] R 944 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)06-0690-04

Pharmacokinetics and bioequivalence of self-assembly nanocapsules loaded with asparaginase

XIE Jiang-chuan, HU Xue-yuan, YAN Zi-jun, ZHOU Yun-li, ZHANG Jing-qing*

Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To study the pharmacokinetics and bioequivalence of asparaginase (Asp) hyaluronic acid-graft-poly(ethylene glycol)/dimethyl-β-cyclodextrin (DCD) nanocapsules (AHDPs) in male Sprague-Dawley (SD) rats. **Methods** AHDPs were observed under the transmission electron microscope. The size, zeta potential and entrapment efficiency of AHDPs were examined. Asp activities were assayed after intravenous injection of AHDPs or free Asp in rats. Pharmacokinetic parameters were calculated by software DAS 2.1.1. Then the bioequivalence of AHDPs and free Asp were evaluated. **Results** The average particle size of AHDPs was (439.63 ± 8.49) nm, zeta potential was (-20.43 ± 2.20) mV, and entrapment efficiency was (55.75 ± 4.11)% (n=3). AUC_(0-48 h) of AHDPs and free Asp were (138.93 ± 0.89) U·mL⁻¹·h and (46.38 ± 1.98) U·mL⁻¹·h, the AUC_{0-∞} were (175.22 ± 13.59) U·mL⁻¹·h and (51.44 ± 3.01) U·mL⁻¹·h, and t_{1/2} was (4.46 ± 1.04) h and (1.86 ± 0.38) h, respectively. Compared with free Asp, the AUC_{0-48 h}, AUC_{0-∞} and t_{1/2} of AHDPs were increased by 3.00, 3.40 and 2.40 times, respectively. The 90% confidential intervals of AUC_{0-48 h}, AUC_{0-∞} and C_{max} were 76.9%~78.3%, 76.9%~78.3% and 92.8%~94.4%, respectively. **Conclusion** AHDPs can prolong the biological half-life and improve the bioavailability of Asp in rats. AHDPs and free Asp are not bioequivalent.

[Key words] asparaginase; nanocapsules; pharmacokinetics; bioequivalence

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(6): 690-693]

天冬酰胺酶(asparaginase, Asp)是一种具有显著抗肿瘤作用的酶制剂^[1]。Asp可通过降解天门冬

酰胺产生天门冬氨酸和氨,从而抑制肿瘤细胞中蛋白质的正常合成,导致肿瘤细胞死亡^[2-3]。但Asp有

[收稿日期] 2015-06-09 **[接受日期]** 2015-09-17

[基金项目] 国家自然科学基金(30973645),重庆市首批高等学校优秀人才资助计划。Supported by National Natural Science Foundation of China (30973645) and the First Batch of High School Outstanding Talent Fund Program in Chongqing.

[作者简介] 谢江川,硕士生。E-mail: 987168036@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: zjqrae01@163.com

生物半衰期短、易被降解、稳定性差等缺点^[3],一定程度上限制了 Asp 的临床应用。

目前,针对 Asp 的缺点,国内外已进行了下列研究:(1)聚乙二醇对 Asp 进行物理包埋^[4-5];(2)制备纳米结构 Asp 脂肪酸生物共轭体^[6];(3)将 Asp 共价结合固定化^[7]等。而郭青龙等^[8]和王弘等^[9]报道的将游离 Asp 制备成前体脂质体,可明显降低 Asp 对小鼠的急性毒性和不良反应。但以上对 Asp 的改善方法都不能使 Asp 发挥其最优的催化活性,且大都存在稳定性较差及 Asp 易脱落等缺点。

自组装纳米囊^[10-11]的空心结构可封装酶、小分子药物、基因等,它具有高度的生物膜相似性,能提高封装药物的稳定性,延长被封装药物的生物半衰期,提高封装药物的生物利用度以及降低不良反应等。本实验制备了载 Asp 自组装透明质酸-聚乙二醇/二甲基-β-环糊精纳米囊[hyaluronic acid-graft-poly (ethylene glycol)/dimethyl-β-cyclodextrin nanocapsules loaded with Asp, AHDPS],并考察了 AHDPS 的透射电镜、粒径、zeta 电位、包封率以及 AHDPS 在大鼠体内的药代动力学和生物等效性。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂 Asp,以色列 Prospec 公司;二甲基-β-环糊精(dimethyl-β-cyclodextrin, DCD),南京都莱生物技术有限公司;AHDPS,实验室自制,批号:20141013、20141017、20141022;Tris-HCl 缓冲液,50 mmol/L,pH 7.3,实验室自配;其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与动物 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);pH 计(上海精密科学仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);Zetasizer Nano zs90 激光粒度电位仪(英国马尔文公司);UV-7504 PC 紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)。

清洁级健康 SD 大鼠,雄性,体质量(250±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(渝)2014-0001。

1.3 AHDPS 的制备^[10-11] 称取适量实验室自制的

透明质酸-聚乙二醇[hyaluronic acid-graft-poly (ethylene glycol), HA-g-PEG]^[12]和 DCD,分别加 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)溶解并定容至 100 mL。将适量的 Asp 溶于 HA-g-PEG 溶液后,于搅拌条件下缓慢加至 DCD 溶液中,搅拌,即得 AHDPS。

1.4 AHDPS 的性质考察

1.4.1 透射电镜下观察 AHDPS 的形态 取 AHDPS 适量,用 Tris-HCl 缓冲液稀释适当倍数后在透射电镜下观察。

1.4.2 粒径和 zeta 电位的测定 取 AHDPS 溶液适量,加入 Tris-HCl 缓冲液稀释一定的倍数后,使用粒度仪检测其粒径和 zeta 电位。

1.4.3 包封率的测定 按照葡聚糖凝胶法^[13]测定。方法如下:吸取 0.5 mL 的 AHDPS 溶液,上 Sephadex G-200 层析柱,Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)以 1 mL/min 流速洗脱,分离 AHDPS 和 Asp。收集 AHDPS 部分,取其中 100 μL,加入乙醚破乳,再加入考马斯亮蓝,在 595 nm 波长处测定光密度(D_{AHDPS})值。以同法处理未过柱的 AHDPS,测定光密度($D_{\text{总}}$)值。包封率(%) = $(D_{\text{AHDPS}}/D_{\text{总}}) \times 100\%$,重复 3 次。

1.5 Asp 活性的测定 参照马斯本-利斯通法^[14]测定 Asp 的活性。改进:实验前样品预热 2 min。

1.6 AHDPS 的药代动力学考察 将 12 只雄性 SD 大鼠随机分为 2 组,分别尾静脉注射 AHDPS 和游离 Asp,剂量均为 2.0 kU/kg^[15]。给药前禁食 24 h。分别在给药后 0.08、0.17、0.25、0.50、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24、48 h 眼底静脉丛取血。采血置于肝素化后的试管中,以 $597.7 \times g$ 离心 10 min 后分离血浆样品,按 1.5 项下方法进行活性测定,计算血浆样品中 Asp 的活性。根据所测结果绘制平均血药浓度-时间曲线,用 DAS 2.1.1 软件计算药代动力学参数。

1.7 生物等效性的评价 将 AHDPS 和游离 Asp 的主要药代动力学参数 $AUC_{0-48\text{h}}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 及 C_{max} 进行方差分析,再采用双向单侧 t 检验和 90% 置信区间考察; T_{max} 采用非参数统计 Wilcoxon 检验。评价 AHDPS 和游离 Asp 是否具有生物等效性。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 AHDPs的性质 如图1所示,透射电镜下观察到AHDPs呈均匀分布的圆形或椭圆形。其粒径和zeta电位测定结果见图2,测得AHDPs的平均粒径为 $(439.63 \pm 8.49) \text{ nm}$ ($n=3$),zeta电位为 $(-20.43 \pm 2.20) \text{ mV}$ ($n=3$)。经计算,AHDPs的平均包封率为 $(55.75 \pm 4.11)\%$ ($n=3$)。

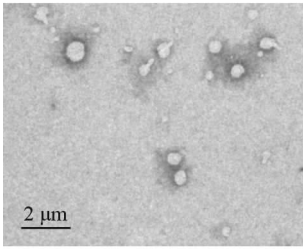


图1 AHDPs的透射电镜图

Fig 1 The transmission electron microscopy image of AHDPs

AHDPs: Hyaluronic acid-graft-poly (ethylene glycol)/dimethyl-β-cyclodextrin nanocapsules loaded with asparaginase

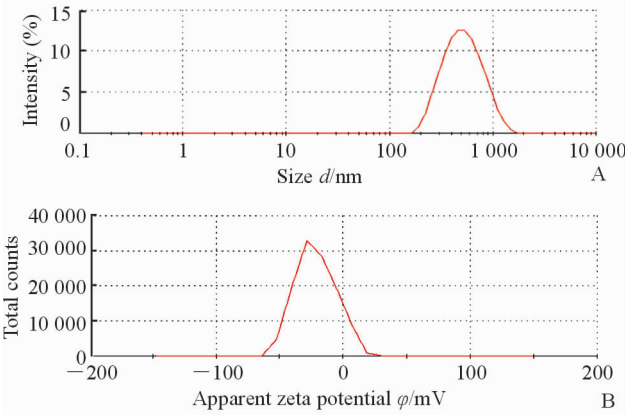


图2 AHDPs的粒径分布图(A)和zeta电位分布图(B)

Fig 2 Size distribution profiles (A) and zeta potential profiles (B) of AHDPs

AHDPs: Hyaluronic acid-graft-poly (ethylene glycol)/dimethyl-β-cyclodextrin nanocapsules loaded with asparaginase

2.2 药时曲线和药动力学参数 以时间为横坐标,平均血药浓度为纵坐标,分别建立静脉注射游离Asp和AHDPs后Asp在大鼠体内的药-时曲线(图3)。游离Asp和AHDPs在SD大鼠体内的药代动力学参数见表1。如图3所示,大鼠静脉注射游离Asp后,Asp失活较快,6h时几乎完全失活,8h时完全失活。而AHDPs静注给药后,Asp失活较慢,6h时仍有较高活性,12h时才完全失活。结果表明,

AHDPs延长了Asp在大鼠体内的滞留时间,提高了Asp在大鼠体内的稳定性。

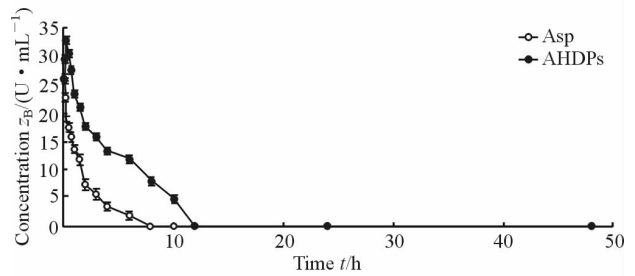


图3 大鼠静脉给予游离Asp和AHDPs后的平均血药浓度-时间曲线

Fig 3 Mean concentration-time curve of free Asp and AHDPs with intravenously administration

Asp: Asparaginase; AHDPs: Hyaluronic acid-graft-poly (ethylene glycol)/dimethyl-β-cyclodextrin nanocapsules loaded with Asp.

$n=6, \bar{x} \pm s$

表1 SD大鼠静脉注射游离Asp和AHDPs后的主要药动力学参数

Tab 1 Main pharmacokinetic parameters after injecting AHDPs and free Asp in rats

Index	$n=6, \bar{x} \pm s$	
	Asp	AHDPs
$AUC_{0-48 \text{ h}}$ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$)	46.38 ± 1.98	138.93 ± 0.89
$AUC_{0-\infty}$ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$)	51.44 ± 3.01	175.22 ± 13.59
$C_{\text{max } z_B}$ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	26.06 ± 0.88	32.56 ± 0.57
$t_{1/2}$ t/h	1.86 ± 0.38	4.46 ± 1.04

Asp: Asparaginase; AHDPs: Hyaluronic acid-graft-poly (ethylene glycol)/dimethyl-β-cyclodextrin nanocapsules loaded with Asp

由表1可以看出,AHDPs的 $t_{1/2}$ 约为游离Asp的2.40倍,说明AHDPs消除较慢,能有效延长Asp在大鼠体内生物半衰期。AHDPs的 $AUC_{0-48 \text{ h}}$ 约为游离Asp的3倍,说明AHDPs提高了游离Asp的生物利用度。

2.3 生物等效性评价结果 经DAS 2.1.1软件处理得出AHDPs与游离Asp的 $AUC_{0-48 \text{ h}}$ 的90%置信区间为76.9%~78.3%,生物等效性标准区间为80%~125%; $AUC_{0-\infty}$ 的90%置信区间为76.9%~78.3%,生物等效性标准区间为80%~125%; C_{max} 的90%置信区间为92.8%~94.4%,生物等效性标准区间为70%~143%。由实验结果可以看出,AHDPs与游离Asp的 $AUC_{0-48 \text{ h}}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 2个参

数的90%置信区间均不在生物等效性标准区间范围内,因此 AHDPs 与游离 Asp 生物不等效。另外,对 T_{max} 进行非参数法检验结果显示 AHDPs 和游离 Asp 的 T_{max} 差异有统计学意义($P < 0.05$)。按照生物等效性的判定标准, AHDPs 与游离 Asp 不具有生物等效性。

3 讨论

本实验采用自组装法成功制备了 AHDPs,并对 AHDPs 在大鼠体内的药代动力学和生物等效性进行了研究,实验结果显示,将 Asp 制成 AHDPs 使 Asp 的静注生物利用度提高至约游离 ASP 的 3.00 倍,半衰期 $t_{1/2}$ 延长至约游离 ASP 的 2.40 倍。说明 AHDPs 提高了 Asp 在体内的生物利用度和稳定性,并延长了 Asp 在体内的生物半衰期。可能的原因是:(1) AHDPs 具有生物相似性,能有效增加 Asp 的生物利用度;(2) AHDPs 的空心纳米囊结构能阻挡抗蛋白水解酶及抗原与 Asp 的接触,在一定程度上能增强 Asp 的稳定性。AHDPs 与游离 Asp 不具生物等效性,即 AHDPs 与 Asp 吸收速度的差别具有临床意义。

相对于 Asp 的其他制剂, AHDPs 具有很大优势:(1)新颖性好。HA-g-PEG/DCD 作为酶或药物的递送体系在国内外尚未见报道,用 AHDPs 作为 Asp 的递送体系具有明显的新颖性。(2)包封率高。AHDPs 的包封率可达到 $(55.75 \pm 4.11)\%$ ($n=3$)。 (3)活性高。用 AHDPs 对 Asp 进行包封后,活性高于游离 Asp。(4)生物半衰期长,生物利用度高。AHDPs 延长了 Asp 在大鼠体内的生物半衰期,提高了 Asp 在大鼠体内的生物利用度,且 AHDPs 与游离 Asp 不具有生物等效性。

[参考文献]

- [1] VAN DEN BERG H. Asparaginase revisited [J]. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52: 168-178.
- [2] NARTA U K, KANWAR S S, AZMI W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 61: 208-221.
- [3] MOHAN-KUMARI H P, DHALE M A, AKHILENDER NAIDU K, VIJAYALAKSHMI G. Antioxidant effect of red mould rice in hypercholesterolemic Wistar male rats [J]. *Cell Biochem Funct*, 2011, 29: 597-602.
- [4] 霍红光,方波,江体乾. 聚乙二醇改性壳聚糖固定化 L-天门冬酰胺酶的工艺研究[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2005, 31: 13-17.
- [5] 钱国强,周菊岩,马建标,王道宾,何炳林. 壳聚糖微球固定化 L-天门冬酰胺酶研究[J]. *高等学校化学学报*, 1996, 17: 1147-1150.
- [6] ASHRAFI H, AMINI M, MOHAMMADI-SAMANI S, GHASEMI Y, AZADI A, TABANDEH M R, et al. Nanostructure L-asparaginase-fatty acid bioconjugate: synthesis, preformulation study and biological assessment[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 62: 180-187.
- [7] 张雨青,相入丽,阎海波,陈晓晓. 丝素纳米颗粒的制备及应用于 L-天门冬酰胺酶的固定化[J]. *高等学校化学学报*, 2008, 29: 25-36.
- [8] 郭青龙,陈真,丁启龙. L-天门冬酰胺酶前体脂质体对小鼠毒性及对实验性肿瘤作用[J]. *中国药科大学学报*, 2001, 32: 67-69.
- [9] 王弘,吴梧桐,顾学裘,郭青龙. 重组 L-天门冬酰胺酶前体脂质体对急性淋巴白血鼠的治疗作用和毒性考察[J]. *中国医院药学杂志*, 2001, 21: 216-218.
- [10] HA W, MENG X W, LI Q, FAN M M, PENG S L, DING L S, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation[J]. *Soft Matter*, 2010, 6: 1405-1408.
- [11] LI Q, XIA B, BRANHAM M, HA W, WU H, PENG S L, et al. Self-assembly of carboxymethyl konjac glucomannan-g-poly(ethylene glycol) and α -cyclodextrin to biocompatible hollow nanospheres for glucose oxidase encapsulation [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86: 120-126.
- [12] 谢江川,何丹,晏子俊,周云莉,张景勍. 载天门冬酰胺酶的自组装聚乙二醇-透明质酸/二甲基- β -环糊精纳米粒体外稳定性的初步考察[J]. *中国医药工业杂志*, 2015, 46: 716-721.
- [13] TAN Q, ZHANG J, WANG N, LI X, XIONG H, TENG Y, et al. Uricase from *Bacillus fastidious* loaded in alkaline enzymosomes; enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 82: 43-48.
- [14] 施特尔马赫 B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊译. 北京:中国轻工业出版社, 1992: 85-88.
- [15] KONECNA P, KLEJDUS B, HRSTKOVA H. Monitoring the asparaginase activity and asparagine levels in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with different asparaginase preparations [J]. *Scripta Medica*, 2004, 77: 55-62.