

天门冬酰胺酶纳米囊的药动学及生物等效性研究

晏子俊, 李万玉, 李瑶, 胡雪原, 何丹, 张景勍*

(重庆医科大学 重庆药物高校工程研究中心, 重庆 400016)

摘要: 作者研究了载天门冬酰胺酶 (Asparaginase, AN) 自组装透明质酸-聚乙二醇 (Hyaluronic acid-graft-poly (ethylene glycol), HA-g-PEG)/ γ -环糊精 (γ -cyclodextrin, γ -CD) 纳米囊 (HA-g-PEG/ γ -CD nanocapsules loaded with AN, AHRPs) 在雄性 SD 大鼠体内的药代动力学和生物等效性。考察了 AHRPs 的透射电镜、粒径、Zeta 电位、包封率, 并分别测定大鼠静脉给予 AHRPs 和游离 AN 后, 不同时间点大鼠血浆样品中 AN 的活性。采用 DAS 2.1.1 软件计算药动学参数, 对 AHRPs 和游离 AN 进行生物等效性评价。经计算, AHRPs 的平均粒径为 (410.30 ± 3.20) nm, Zeta 电位为 (-31.40 ± 1.65) mV, 平均包封率为 $(42.80 \pm 4.37)\%$ 。AHRPs 和游离 AN 的主要药动学参数 $AUC_{(0-48\text{ h})}$ 分别为 (104.01 ± 1.68) U/(mL·h) 和 (46.38 ± 1.98) U/(mL·h), $AUC_{(0-\infty)}$ 分别为 (131.03 ± 19.67) U/(mL·h) 和 (51.44 ± 3.01) U/(mL·h), $t_{1/2}$ 分别为 (4.31 ± 1.53) h 和 (1.86 ± 0.38) h。与游离 AN 比较, AHRPs 的 $AUC_{(0-48\text{ h})}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ 和 $t_{1/2}$ 分别提高了 2.24、2.55 和 2.32 倍。 $AUC_{(0-48\text{ h})}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ 和 $C_{\max}$ 的 90% 可信区间分别为 77.1%~78.7%、76.7%~78.3%、98.9%~100.5%。AHRPs 延长了 AN 在大鼠体内的生物半衰期, 提高了 AN 在大鼠体内的生物利用度, 且 AHRPs 与游离 AN 不具有生物等效性。

关键词: 天门冬酰胺酶; 纳米囊; 药代动力学; 生物等效性

中图分类号: Q 556; R 392-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)05-0461-05

Pharmacokinetics and Bioequivalability of Asparaginase Nanocapsules

YAN Zijun, LI Wanyu, LI Yao, HU Xueyuan, HE Dan, ZHANG Jingqing*

(Engineering Research Center in University, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: To study the pharmacokinetics and bioequivalence of asparaginase hyaluronic acid-graft-poly(ethylene glycol)/ γ -cyclodextrin nanocapsules (AHRPs) in SD rats. We observed the image of AHRPs under the transmission electron microscopy. Size, Zeta potential, entrapment efficiency were detected. The AN activity was assayed after the intravenous injection of AHRPs and free AN into rats. The pharmacokinetic parameters were calculated by software DAS 2.1.1, then the bioequivalence was judged. The average particle size was (410.30 ± 3.20) nm, Zeta potential was (-31.40 ± 1.65) mV, average entrapment efficiency was $(42.80 \pm 4.37)\%$. $AUC_{(0-48\text{ h})}$ of AHRPs and

收稿日期: 2015-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30973645); 重庆市首批高等优秀人才资助计划(X10058); 重庆市研究生科研创新项目(CYS16133)。

* 通信作者: 张景勍(1973—), 女, 重庆人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 从事药物新剂型与新技术研究工作。

E-mail: zjqrae01@163.com

引用本文: 晏子俊, 李万玉, 李瑶, 等. 天门冬酰胺酶纳米囊的药动学及生物等效性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(05): 461-465.

free AN was (104.01 ± 1.68) U/(mL·h) and (46.38 ± 1.98) U/(mL·h), $AUC_{(0-\infty)}$ was (131.03 ± 19.67) U/(mL·h) and (51.44 ± 3.01) U/(mL·h), $t_{1/2}$ was (4.31 ± 1.53) h and (1.86 ± 0.38) h, respectively. Compared with free AN, $AUC_{(0-48\text{ h})}$, $AUC_{(0-\infty)}$ and $t_{1/2}$ of AHRPs were increased 2.24, 2.55 and 2.32 times, respectively. The 90% confidential intervals of $AUC_{(0-48\text{ h})}$, $AUC_{(0-\infty)}$ and $C_{\max}$ of tested formulation were 77.1%~78.7%, 76.7%~78.3%, 98.9%~100.5%, respectively. AHRPs can improve the bioavailability and extend the biological half-life of AN in rats. AHRPs and free AN are not bioequivalent.

Keywords: asparaginase, nanocapsules, pharmacokinetics, bioequivalability

天门冬酰胺是细胞合成蛋白质的必需氨基酸。某些肿瘤细胞(如淋巴白血病细胞等)缺乏天门冬酰胺合成酶而不能合成天门冬酰胺,须依赖宿主供给。给予天门冬酰胺酶(Asparaginase, AN)后,AN通过降解患者体内的天门冬酰胺而抑制肿瘤细胞中蛋白质的正常合成,从而使肿瘤细胞死亡,而正常细胞有能力进行自身合成而不受影响^[1-2]。但AN在临床应用上存在着生物半衰期短、易被降解、稳定性差等缺点^[3],限制了AN在临床上的应用。因此,延长AN的生物半衰期、增加AN的稳定性和提高AN的生物利用度已成为AN研究热点。近来,文献^[4-5]中报道的自组装纳米囊是一种新型的药物载体,其空心结构可封装酶、小分子药物、基因等,它具有生物膜的相似性,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毒副作用等特点。

本文中依据上述思路,将透明质酸-聚乙二醇(Hyaluronic acid-graft-poly ethylene glycol, HA-g-PEG)与 γ -环糊精(γ -cyclodextrin, γ -CD)采用自组装方法制得载带AN的HA-g-PEG/ γ -CD纳米囊(HA-g-PEG/ γ -CD nanocapsules loaded with AN, AHRPs),并考察了AHRPs的透射电镜、粒径、Zeta电位、包封率以及AHRPs在大鼠体内的药代动力学和生物等效性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 主要材料、试剂 AN (225 IU/mg, 纯度 $\geq 96.0\%$, 批号:312PLASP11);购自以色列 Prospec 公司;HA(纯度: $>99.0\%$, 相对分子质量:12 000, 批号:20131027);购自曲阜市广龙生物制品厂; γ -CD(纯度: $>98.0\%$, 相对分子质量:1297.12, 批号:C0014);

购自都莱生物技术有限公司;PEG(相对分子质量:2 000, 规格:250 g);购自 Sigma-aldrich 公司;HA-g-PEG(批号:20141012;20141016;20141021);作者所在实验室提供;Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 7.3),作者所在实验室自配;其它试剂均为分析纯。

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

清洁级健康 SD 大鼠,雄性,体重 (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)。

1.2 试验方法

1.2.1 AHRPs 的制备 将适量溶有 AN 的 HA-g-PEG 溶液缓慢滴加至 γ -CD 饱和溶液中,一定温度下磁力搅拌 2 h 后,即得 AHRPs^[6-8](批号:20141013;20141017;20141022)。

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

1.2.3 AHRPs 粒径和 Zeta 电位的测定 使用马尔文粒度仪检测 AHRPs 的粒径和 Zeta 电位。方法如下:取 AHRPs 溶液适量,加入 Tris-HCl 缓冲液稀释一定的倍数后,测定 AHRPs 的粒径和 Zeta 电位。

1.2.4 AHRPs 包封率的测定 按照葡聚糖凝胶法^[9]测定 AHRPs 的包封率。方法如下:制备过柱后的 AHRPs,在 595 nm 波长下,测得吸光度 A_1 。同法处理,测得未过柱的 AHRPs 的吸光度 A_2 。由测得的吸收值 A_1 和 A_2 计算出 1 mL AHRPs 混悬液中制剂所

含 AN 的质量 M_1 和 AHRPs 混悬液中 AN 总质量 M_2 ,包封率按照如下公式计算:

$$\text{包封率} = (M_1/M_2) \times 100\%$$

上式中, M_1 为 AHRPs 混悬液中制剂所含 AN 的质量, M_2 为 AHRPs 混悬液中 AN 总质量。

1.2.5 AN 活性的测定 主要参照马斯本-利斯通法^[6,10]测定 AN 的活性,并进行改进即实验前样品预热 2 min。

1.2.6 药代动力学

1) 动物的饲养。雄性 SD 大鼠购买后饲养 7 d 以上用于实验,环境温度为 $(25.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(50 \pm 10)\%$,自由饮水和进食。

2) 动物的分组和给药。将 12 只雄性 SD 大鼠随机分为两组,每组 6 只。分别尾静脉注射给予 AHRPs 和游离 AN,剂量均为 2.0 kU/kg。给药前禁食 24 h。

3) 样品的采集和处理^[11-12]。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,以 3 000 r/min 离心 10 min 后分离血浆样品,按“1.2.5 AN 活性的测定”项下方法进行活性测定,计算血浆样品中 AN 的活性,进行 AHRPs 的药动力学研究。

4) 实验数据处理方法。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。

1.2.7 生物等效性的评价 将 AHRPs 和游离 AN 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(显著性水平 $P=0.05$),90%可信限考察, $T_{\max}$ 采用非参数统计 Wilcoxon 检验。评价 AHRPs 和游离 AN 是否具有生物等效性($\alpha=0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 AHRPs 在透射电镜下的形态

透射电镜下观察到 AHRPs 呈均匀分布的圆形或椭圆形,如图 1 所示。

2.2 AHRPs 的粒径和 Zeta 电位

马尔文激光粒度电位仪测得 AHRPs 的平均粒径为 (410.30 ± 3.20) nm, Zeta 电位为 (-31.40 ± 1.65) mV。

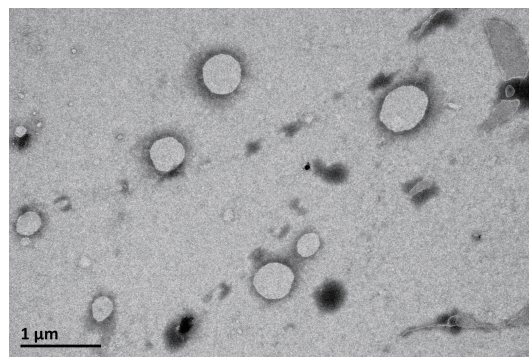


图 1 AHRPs 的透射电镜图

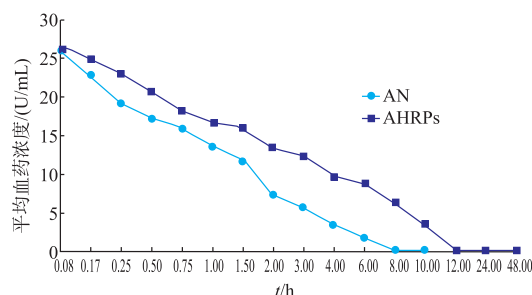
Fig. 1 Transmission electron microscopy image of AHRPs

2.3 AHRPs 的包封率

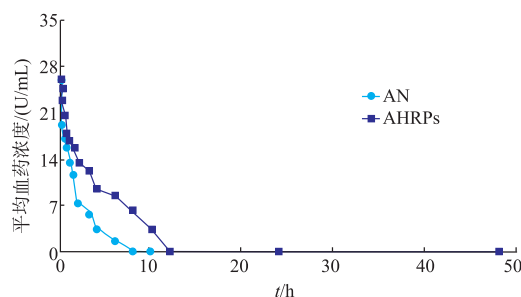
测得 3 批 AHRPs 的包封率分别为:38.75%、42.20%和 47.44%。用 excel 2007 进行数据统计,统计结果用均数±标准差表示。经计算,AHRPs 的包封率为 $(42.80 \pm 4.37)\%$ ($n=3$)。

2.4 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,建立了 AN 在大鼠体内 AHRPs 和游离 AN 的药-时曲线(见图 2),图 2(a)为取血时间点下的药-时曲线,图 2(b)为相等时间间隔下的药-时曲线。AHRPs 和游离 AN 在 SD 大鼠体内的药代动力学参数见表 1。



(a)取血时间点的药-时曲线



(b)相同时间间隔下的药-时曲线

图 2 大鼠静脉给予 AHRPs 和游离 AN 后的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Mean concentration-time curves of AHRPs and free AN with intravenous administration

如图 2 所示,大鼠静脉注射游离 AN 后,AN 失活较快,6 h 时几乎完全失活,8 h 时完全失活。而 AHRPs 静注给药后,AN 失活较慢,6 h 时仍有较高活性,12 h 时才完全失活。结果表明,AHRPs 延长了 AN 在大鼠体内的滞留时间,提高了 AN 在大鼠体内的稳定性。

表 1 SD 大鼠静脉注射 AHRPs 和游离 AN 后的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters after the injection of AHRPs and free AN into rats

参数	AHRPs	AN
$AUC_{(0-48 h)}/(U/(mL \cdot h))$	104.01 ± 1.68	46.38 ± 1.98
$AUC_{(0-\infty)}/(U/(mL \cdot h))$	131.03 ± 19.67	51.44 ± 3.01
$C_{max}/(U/mL)$	26.31 ± 0.35	26.06 ± 0.88
$t_{1/2}/h$	4.31 ± 1.53	1.86 ± 0.38

由表 1 参数可以看出:(1)AHRPs 的半衰期 $t_{1/2}$ 为 (4.31 ± 1.53) h, 游离 AN 的为 (1.86 ± 0.38) h, AHRPs 的 $t_{1/2}$ 为游离 AN 的 2.32 倍,说明 AHRPs 消除较慢,能有效延长 AN 在大鼠体内生物半衰期。(2)AHRPs 的 $AUC_{(0-48 h)}$ 为 (104.01 ± 1.68) U/(mL·h), 是游离 AN 的 2.24 倍,说明 AHRPs 显著提高了游离 AN 的生物利用度。

2.5 生物等效性评价结果

由实验结果可以看出,AHRPs 与游离 AN 的 $AUC_{(0-48 h)}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ 和 C_{max} 3 个参数的 90% 可置信区间均不在生物等效性标准区间范围内,因此 AHRPs 与游离 AN 生物等效性不合格。另外,对 T_{max} 进行非参数法检验,结果显示 AHRPs 和游离 AN 的 T_{max} 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。按照生物等效性的判定标准,AHRPs 与游离 AN 不具有生物等效性,即 AHRPs 的药效学标准明显比游离 AN 的高。

表 2 大鼠静注 (2 kU/kg, i.v.) AHRPs 和游离 AN 后,生物等效性的比较

Table 2 Bioequivalence comparison of AHRPs and free AN via oral (at the identical dose of 50 mg/kg of JM) and intravenous (at the dose of 2 kU/kg of AN) routes, respectively, $n=6$ per group

参数	90% 置信区间	生物等效性标准	P 值
$AUC_{(0-48 h)}$	77.1%~78.7%	80%~125%	—
$AUC_{(0-\infty)}$	76.7%~78.3%	80%~125%	—
C_{max}	98.9%~100.5%	70%~143%	—
T_{max}			<0.05

3 结语

AN 在临床应用上存在生物半衰期短、稳定性差和毒副作用等缺点。目前,针对 AN 的缺点,国内外已进行了下列研究:聚乙二醇对 AN 进行物理包埋或修饰^[15-16];制备纳米结构 AN 脂肪酸生物共轭体^[17];将 AN 共价结合固定化于丝素纳米颗粒^[18];将 AN 制备成前体脂质体^[19-20]等。但以上对 AN 的改善方法都不能使 AN 发挥其最优的催化活性,且大都会存在较低的生物相容性、较差的稳定性及 AN 易脱落等缺点。

作者首次采用自组装法成功制备了 AHRPs,并对 AHRPs 在大鼠体内的药代动力学和生物等效性进行了研究,以期能提高 AN 在大鼠体内的稳定性,延长 AN 的生物半衰期,并提高其生物利用度。实验结果显示,将 AN 制成 AHRPs,使 AN 的静注生物利用度提高了 2.24 倍,半衰期 $t_{1/2}$ 延长了 2.32 倍。说明 AHRPs 提高了 AN 在体内的生物利用度和稳定性,并延长了 AN 在体内的生物半衰期。可能的原因是:该纳米囊材料具有生物相似性,能有效提高 AN 的吸收;空心纳米囊结构,能阻挡抗胰蛋白水解酶及抗原与 AN 的接触,因此在一定程度上能增强 AN 的稳定性。且根据生物等效性判断标准,AHRPs 与游离 AN 生物等效性不合格,即 AHRPs 的药效学标准明显比游离 AN 的高。本文中首次制备 AHRPs,且对其在大鼠体内的药代动力学和生物等效性进行了研究,故具有一定的前瞻性,也为 AN 在临床上的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] ZHOU Jining, JIN Hao, LI Yongfeng, et al. Progress in researches on anti-tumor agent L-asparaginase for treatment of leukemia [J]. **J Biomed Eng**, 2000, 17(3): 343-345. (in Chinese)
- [2] LI Xiaoyuan, CHEN Jianhua, WU Wutong. Recent advances in clinical studies on PEG-L-asparaginase [J]. **Progress in Pharmaceutical Sciences**, 2009, 33(11): 503-510. (in Chinese)
- [3] HAFSA K E, WU Wutong, LIU Jingjing, et al. The *E. coli* L-asparaginase was modified with activated dextran and PEG-2 [J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 1997, 4(2): 118-121. (in Chinese)
- [4] ARAVIND A, JEYAMOHAN P, NAIR R, et al. AS1411 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanocapsules for tumor cell targeting and drug delivery [J]. **Biotechnol Bioeng**, 2012, 109(11): 2920-31.
- [5] HA W, FAN M M, PENG S L, et al. Self-assembly of chitosan-g-PEG and α -cyclodextrin into hollow spheres in aqueous solution [J]. **J Control Release**, 2011, 152(Suppl 1): e204-e205.
- [6] HA W, MENG X W, LI Q, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation [J]. **Soft Matter**, 2010, 6(7): 1405-1408.
- [7] LI Q, XIA B, BRANHAM M, et al. Self-assembly of carboxymethyl konjac glucomannan-g-poly (ethylene glycol) and (α -cyclodextrin) to biocompatible hollow nanospheres for glucose oxidase encapsulation [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2011, 86(1): 120-126.
- [8] 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(23): 14401-14407.
- [9] WANG Hong, WU Wutong, GU Xueqiu. Preparation of proliposomes and the determination of encapsulation of recombinant L-asparaginase [J]. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**, 1999, 16(4): 235-238. (in Chinese)
- [10] 施特尔马赫. 酶的测定方法 [M]. 钱嘉渊, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 85-88.
- [11] 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(2): 55-62.
- [12] CHEN Jianhua, WU Wutong, HIRANO K. Antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for determination of recombinant *E. coli* L-asparaginase in rat plasma and its pharmacokinetics [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2003, 38(8): 613-616. (in Chinese)
- [13] ZHONG Jingjie, WANG Dongkai, ZHANG Cuixia, et al. Pharmaceutical significance of sodium alginate [J]. **Chinese Journal of New Drugs**, 2007, 16(8): 591-594. (in Chinese)
- [14] UMESH K N, SHAMSHER S K, WAMIK A. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia [J]. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 2007, 61(3): 208-221.
- [15] MOLINEUX G. Engineering improved biopharmaceuticals for oncology [J]. **Pharmacotherapy**, 2003, 23(8Part2): 3S-8S.
- [16] AARONSON S A. Cancer medicine [M]. 5th ed. Hamilton: B. C. Decker Inc. 2000: 2140.
- [17] ASHRAFI H, AMINI M, MOHAMMADI S S. Nanostructure AASarginase-fatty acid bioconjugate: Synthesis, preformulation study and biological assessment [J]. **Int J Biol Macromol**, 2013, 62: 180-187.
- [18] ZHANG Yuqing, XIANG Ruli, YAN Haibo, et al. Preparation of silk fibroin nanoparticles and their application to immobilization of L-asparaginase [J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 2008, 3(10): 25-36. (in Chinese)
- [19] GUO Qinlong, CHEN Zhen, DING Qilong. Effect of L-asparaginase, proliposome on toxicity in mice and experimental tumor [J]. **Journal of China Pharmaceutical University**, 2001, 32(1): 67-69. (in Chinese)
- [20] WANG Hong, WU Wutong, GU Xueqiu, et al. Effect of recombinant L-asparaginase proliposome on the acute lymphatic leukaemia and the toxicity in mice [J]. **Chin Hosp Pharm J**, 2001, 21(4): 216-218. (in Chinese)