

## 重组水蛭素-2鼻腔喷雾剂的药代动力学和药效学

张玉杰<sup>1\*</sup>, 张强<sup>2</sup>, 侯俊玲<sup>1</sup>, 王筱亮<sup>1</sup>, 陈明霞<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 北京大学 药学院, 北京 100083)

**摘要:** 目的 研究重组水蛭素-2 (rHV2) 喷雾剂鼻腔给药后在大鼠体内的药代动力学过程及其抗凝血作用。方法 采用呈色肽法测定大鼠鼻腔给予 rHV2 喷雾剂后血浆中 rHV2 的浓度, 并计算其药代动力学参数; 考察 rHV2 鼻腔喷雾剂对正常大鼠和弥散性血管内凝血模型 (DIC) 家兔凝血时间的影响。结果 rHV2 喷雾剂鼻腔给药后, rHV2 的体内过程符合一室模型, 其相对生物利用度为 28.53%; rHV2 鼻腔喷雾剂可使正常大鼠活化的部分凝血活酶时间 (APTT) 和凝血酶时间 (TT) 明显延长, 使 DIC 模型家兔的 APTT 凝血时间明显缩短, 接近正常值。结论 药代动力学和药效学结果证明, rHV2 鼻腔喷雾剂有望成为 rHV2 鼻腔给药的有效制剂。

**关键词:** 重组水蛭素-2; 鼻腔喷雾剂; 药代动力学; 抗凝作用

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)03 - 0268 - 04

## The pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant hirudin-2 nasal spray

ZHANG Yu-jie<sup>1\*</sup>, ZHANG Qiang<sup>2</sup>, HOU Jun-ling<sup>1</sup>, WANG Xiao-liang<sup>1</sup>, CHEN Ming-xia<sup>1</sup>

(1. Department of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

**Abstract: Aim** To investigate the pharmacokinetics and the anticoagulation action of recombinant hirudin-2 (rHV2) nasal spray after administration of the preparation. **Methods** rHV2 concentration in plasma was determined by chromogenic substrate method and the relative bioavailability was calculated. The anticoagulation action of rHV2 spray after intranasal administration in normal rats and DIC model rabbits after intranasal administration of rHV2 spray were studied. **Results** The *in vivo* course of rHV2 in rats fitted to the one-compartment model after intranasal administration of rHV2 spray and the relative bioavailability was 28.53%. Coagulating times of APTT and TT were significantly prolonged in normal rats, and APTT in DIC model rabbits was significantly shortened and was close to the normal values after administration of rHV2 nasal spray. **Conclusion** rHV2 spray could be an effective nasal preparation of rHV2.

**Key words:** recombinant hirudin-2; nasal spray; pharmacokinetics; anticoagulation

水蛭素是近年来发现的新型高效抗凝血药物, 它是一个由 65 或 66 个氨基酸组成的多肽 (M<sub>r</sub> 7 000 D), 是迄今发现的最强的凝血酶特异性抑制剂, 较之其他抗凝药物, 如肝素等在安全性、抗原性和毒性等方面更具优越性, 临床上主要用于治疗肝素诱导的血小板减少症、急性冠脉综合征和动静脉血栓

等<sup>[1,2]</sup>。目前的水蛭素制剂仍以注射剂为主。但是注射给药在体内半衰期短, 仅为 1~2 h, 反复注射会给患者带来很大的痛苦和不便, 难以适应大多数慢性高凝状态疾病患者长期抗凝治疗的需要, 因此, 设法寻找非注射给药途径, 减少给药次数, 提高生物利用度, 已成为改善水蛭素应用的一个重要方面<sup>[3]</sup>。

为此, 本文将生物黏附系统和吸收促进剂两种提高多肽鼻黏膜吸收的方式结合起来, 研制了水蛭素鼻腔给药制剂, 探讨在二者共同作用下对水蛭素鼻腔吸收的提高作用并对其药动和药效行为进行了

收稿日期: 2005-06-01.

\* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 64711199 - 6027,

Fax: 86 - 10 - 64721242, E-mail: zhyj227@126.com

研究。

## 材料与方 法

**药品、辅料和试剂** 重组水蛭素-2(recombinant hirudin-2, rHV2, 抗凝活性  $6\ 800\ \text{ATU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 北京大学生命科学院); Tris-HCl(Sigma公司)。Chromozym TH(德国 Roche公司); APTT和 TT测定试剂盒(上海太阳生物技术公司); 大肠杆菌内毒素(中国药品生物制品鉴定所); 其他试剂均为分析纯。

**主要仪器** U-2000型紫外分光光度计(日立公司, 日本)。

**实验动物** 雄性 SD大鼠, 体重  $(300 \pm 20)\ \text{g}$ , 合格证号: SCXK(京)2002·0003; 雄性日本大耳白兔, 体重  $(2.5 \pm 0.5)\ \text{kg}$ , 北京维通利华实验动物中心。

**数据处理软件** DAS药物与统计软件(安徽省临床药物评价中心)。

**rHV2鼻腔喷雾剂的制备** 取壳聚糖( $M_n\ 250\ \text{kD}$ , 脱乙酰度  $>85\%$ )加  $1\%$  醋酸水溶液使溶解, 配成质量浓度为  $0.5\%$  的溶液( $w/v$ ), 用  $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 调节 pH 至 5.0, 然后依次加入吸收促进剂和 rHV2, 搅拌使之完全溶解, 二者的浓度分别达到  $5.0\%$  和  $7.2\%$ , 即得。

**呈色肽法测定血浆中 rHV2含量的方法** 参照 Griebach<sup>[4]</sup>方法并略有改动。取血浆  $0.1\ \text{mL}$  ( $3.8\%$  柠檬酸钠抗凝, 血液与柠檬酸溶液的比例是  $8.75:1.25$ ) 加入  $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸  $0.01\ \text{mL}$ , 涡旋混和,  $65\ ^\circ\text{C}$  水浴孵育  $20\ \text{min}$ 。冷却后加入  $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH  $0.01\ \text{mL}$ , 冰水浴  $5\ \text{min}$ 。  $5\ 000 \times g$  离心  $10\ \text{min}$ 。分取上清液, 加入  $30\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  凝血酶溶液  $4\ \mu\text{L}$  及 Tris-HCl(pH 8.3)缓冲液, 混匀,  $37\ ^\circ\text{C}$  水浴孵育  $5\ \text{min}$ 。再加入  $1.9\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Chromozym TH 溶液  $16\ \mu\text{L}$ , 涡旋混和,  $37\ ^\circ\text{C}$  水浴孵育  $10\ \text{min}$ 。加入  $33\%$  醋酸溶液  $200\ \mu\text{L}$  终止反应, 样品总体积为  $612\ \mu\text{L}$ 。在  $405\ \text{nm}$  处测定吸收度, 计算血浆中 rHV2含量。

**大鼠体内药代动力学过程的考察<sup>[5]</sup>** 正常大鼠实验前禁食  $12\ \text{h}$ , 腹腔注射  $20\%$  乌拉坦生理盐水溶液 ( $1.8\ \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 麻醉。手术分离气管、食管及颈动脉。在气管上做一切口, 插入软管以供呼吸, 结扎食管, 另在左颈动脉处做一插管, 供采血。用前端带有软管的微量进样器单侧鼻腔给予 rHV2 喷雾剂, 插入鼻孔深度为  $0.5\ \text{cm}$ , 给药剂量为  $25\ \mu\text{L}$  ( $6\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。分别于给药前及给药后  $0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8$  和  $10\ \text{h}$  取血  $0.3\ \text{mL}$  (隔一定时间自股静脉补充生理盐水适量), 用  $3.8\%$  的柠檬酸钠抗凝, 血液

和柠檬酸钠的体积比为  $8.25:1.75$ , 于  $1\ 300 \times g$  离心  $10\ \text{min}$ , 取血浆  $100\ \mu\text{L}$ , 按呈色肽法测定 rHV2 血药浓度水平。另一组大鼠鼻腔给予 rHV2 生理盐水溶液 ( $6\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 同法取血, 测定不同时间 rHV2 血药浓度。每组实验动物数为 5 或 6 只。

以大鼠皮下注射  $1\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  rHV2 溶液作为对照计算相对生物利用度 ( $F_r$ ), 其公式为:

$$F_r = \frac{(AUC_{n1}) \times (Dose_{sc})}{(AUC_{sc}) \times (Dose_{n1})} \times 100\%$$

其中  $n1$  与  $sc$  分别表示鼻腔给药和皮下注射给药。

采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为显著差异;  $P < 0.01$  为极显著差异。

将正常大鼠鼻腔给药组、大鼠皮下注射给药组的体内 rHV2 浓度的数据, 输入计算机, 用 DAS 程序拟合, 分别计算 rHV2 鼻腔给药及皮下注射给药在大鼠体内的药代动力学参数。

**对正常大鼠凝血时间的影响** 依“大鼠体内药代动力学过程的考察”方法, 取大鼠手术, 鼻腔给予 rHV2 喷雾剂 ( $6\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 取血, 分别测定活化的部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)和凝血酶时间(thrombin time, TT)。另一组大鼠鼻腔给予 rHV2 生理盐水溶液 ( $6\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 同法取血, 测定不同时间上述凝血时间的变化。以大鼠皮下注射  $1\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  rHV2 溶液作为对照组。每组实验动物数为 5 或 6 只。

**对弥散性血管内凝血模型(DIC)家兔凝血时间的影响<sup>[6]</sup>** 家兔 18 只, 平均分为 3 组。家兔经耳缘静脉取血, 测定 APTT 后, 其中两组静脉注射细菌内毒素  $2.5\ \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。24 h 后, 取血, 测定 APTT 变化后, 一组鼻腔给予 rHV2 喷雾剂  $200\ \mu\text{L}$  ( $1\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 另一组不给 rHV2 作为模型对照组, 同时两组再经耳缘静脉注射细菌内毒素  $5\ \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 分别于给药后  $3\ \text{h}$  和  $6\ \text{h}$  取血, 测定 APTT 值的变化。第 3 组不作处理作为空白对照, 在规定时间内取血, 测定 APTT 值。

## 结果

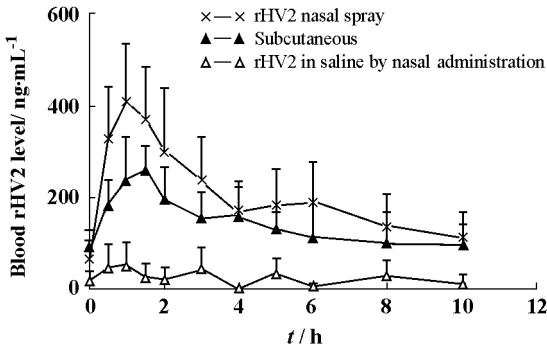
### 1 药代动力学考察结果

#### 1.1 体内样品分析方法的建立

将 rHV2 标准品的吸收度值与 rHV2 的量作线性回归。得到标准曲线回归方程:  $A = 0.386\ 7 - 0.005\ 2C$ ,  $r^2 = 0.992\ 6$ ; 线性范围为  $10 \sim 50\ \text{ng}$ , 检测限  $4\ \text{ng}$ 。方法回收率为  $95.42\% \sim 102.34\%$ 。

### 1.2 rHV2鼻腔喷雾剂在大鼠体内的药代动力学研究

大鼠鼻腔给予 rHV2 喷雾剂和皮下注射 rHV2 的血药浓度-时间曲线见图 1。结果表明两种方式给药后,吸收均较快,并呈现双峰现象。



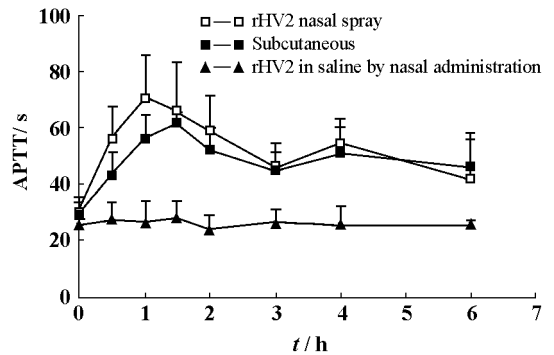
**Figure 1** Blood concentration profiles of rHV2 after subcutaneous (sc) administration of  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  rHV2 and nasal administration of  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  rHV2 to rats.  $n = 5, 6$

大鼠的  $T_{\text{max}}$  和  $C_{\text{max}}$  采用实测值,将第 1 峰的血药浓度观测值用 DAS 药物与统计软件中的房室模型计算,结果判定重组水蛭素在大鼠体内药代动力学模型为一室模型。皮下及鼻腔给药组的药代动力学参数见表 1。

### 2 rHV2鼻腔喷雾剂的药效学试验

#### 2.1 rHV2鼻腔喷雾剂对正常大鼠 APTT 凝血时间的影响

大鼠鼻腔给予 rHV2 喷雾剂和皮下注射 rHV2 的凝血作用-时间曲线见图 2。由结果可以看出,鼻腔给药后,大鼠凝血时间最大值出现在 1 h 左右, APTT 值为 70.43 s。皮下注射凝血时间最大值出现在 1.5 h, APTT 值为 61.36 s。



**Figure 2** Activated partial thromboplastin time (APTT) values profiles after subcutaneous administration (sc) of  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  rHV2 and nasal administration of  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  rHV2 to rats.  $n = 5, 6$

#### 2.2 rHV2鼻腔喷雾剂对正常大鼠及 DIC 模型家兔凝血时间的影响

##### 2.2.1 rHV2鼻腔喷雾剂对正常大鼠凝血时间的影响

正常大鼠经鼻腔给药及皮下注射 rHV2 后对

**Table 1** The pharmacokinetic parameters of subcutaneous ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and nasal ( $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) administration of rHV2 to rats ( $n = 5, 6$ )

Parameter	sc	Nasal spray	Control
$T_{\text{max}} / \text{h}$	1.5	1.0	1.0
$C_{\text{max}} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$259 \pm 74$	$409 \pm 141$	$52 \pm 7$
$T_{1/2} / \text{h}$	$1.08 \pm 0.26$	$1.2 \pm 0.4$	$0.61 \pm 0.22$
MRT/h	$2.4 \pm 0.6$	$2.7 \pm 0.9$	$2.8 \pm 1.0$
VRT/h	$2.0 \pm 0.6$	$2.9 \pm 1.0$	$2.8 \pm 1.0$
$\text{AUC} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$929 \pm 254$	$1590 \pm 603$	$77 \pm 30$
$F_r / \%$	100	$28.53^{* *}$	1.38

sc: Subcutaneous administration; Control:  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  rHV2 in saline by nasal administration;  $^{* *}$   $P < 0.01$  vs control

**Table 2** Effects of rHV2 on the coagulating time after nasal administration to normal rats

t/h	Control/ $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		Nasal spray/ $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		sc/ $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	
	APTT/s	TT/s	APTT/s	TT/s	APTT/s	TT/s
0.5	$34 \pm 6$	$22 \pm 7$	$56 \pm 11^*$	$40 \pm 13^*$	$43 \pm 8^{* *}$	$37 \pm 10^*$
1	$32 \pm 7$	$20 \pm 4$	$70 \pm 16^{* *}$	$57 \pm 23^*$	$56 \pm 8^{* *}$	$49 \pm 19^*$
2	$31 \pm 5$	$25 \pm 7$	$59 \pm 12^{* *}$	$45 \pm 11^*$	$52 \pm 8^{* *}$	$46 \pm 14^*$

APTT: Activated partial thromboplastin time; TT: Thrombin time; sc: Subcutaneous administration; Control: rHV2 in saline by nasal administration.  $n = 5, \bar{x} \pm s. ^* P < 0.05, ^{* *} P < 0.01$  vs control

APTT及TT值的影响,结果见表2。鼻腔给予rHV2鼻腔喷雾剂后的APTT及TT凝血时间较鼻腔给予rHV2生理盐水溶液组明显延长。

**2.2.2 rHV2鼻腔喷雾剂对DIC模型家兔凝血时间的影响** DIC模型家兔经鼻腔给予rHV2后对APTT值的影响,结果见表3。从表中可见,鼻腔给予rHV2鼻腔喷雾剂(1 mg·kg<sup>-1</sup>)对DIC家兔凝血时间可产生明显的影响,使APTT凝血时间明显缩短(P<0.01),接近正常值。

**Table 3** Effects of rHV2 after nasal administration on the coagulating time to various rabbits

t/h	APTT/s		
	DIC model control	Nasal spray	Normal
0	19 ± 4	21 ± 4	19 ± 6
3	36 ± 3	26 ± 6**	23 ± 4
6	37 ± 6	24 ± 4**	21 ± 2

APTT: Activated partial thromboplastin time; DIC: Disseminated intravascular coagulation; n = 5,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* P < 0.01 vs DIC model control

## 讨论

对于水蛭素这种黏膜渗透性较差的亲水性大分子,无论体内和体外检测均要求采用灵敏度高、稳定可重复的方法。呈色肽法系利用生色底物测定系统中剩余凝血酶的酰胺水解活性,从而定量血浆中水蛭素。通常采用 Chromozym TH (Tos-Gly-Pro-Arg-PNA) 为生色底物。凝血酶能使该生色底物的酰胺键水解从而释放出生色物质 4-硝基苯胺。后者可于 405 nm 处测定吸收度。水蛭素能抑制凝血酶的上述反应,并具有定量关系,检测限可达 10 ng 以下<sup>[4,7]</sup>。本法是针对体内活性水蛭素分子的测定,同时对血浆中游离的及与凝血酶结合的水蛭素进行测定,是一种可靠的、被广泛采用的方法,操作也比较简单,不需要特别的仪器,本法的缺点是线性范围较窄,应注意将血浆取样量控制在标准曲线范围内。

大鼠体内药代动力学考察结果表明,rHV2给药后血药浓度曲线呈双峰,水蛭素的这种双峰现象曾有过报道,其机制尚不清楚<sup>[8]</sup>,推测可能与吸收不一致有关。作者将第1峰血药浓度曲线用 DAS 药物与统计软件拟合<sup>[9]</sup>,结果药代动力学模型为一室模型,半衰期与文献<sup>[10,11]</sup>报道基本一致。

水蛭素的抗凝作用取决于其血浆水平,因为其不

仅在血液转运,且作用部位也仅在血液循环系统<sup>[10]</sup>。

水蛭素是一个分子质量约为 7 000 D 的多肽,普通溶液剂很难透过鼻黏膜吸收,达到有效的治疗浓度。本试验结果表明,rHV2水溶液鼻腔给药的生物利用度很低,与皮下给药相比只有 1.38%。而 rHV2鼻腔喷雾剂的相对生物利用度可达 28.53%。较水溶液明显地提高。鼻腔喷雾剂的  $T_{max}$  约为 1 h,起效较快。药效试验表明,rHV2喷雾剂鼻腔给药后无论对正常大鼠还是对高凝状态的模型家兔均可产生良好的抗凝作用。说明以本法制备的 rHV2鼻腔喷雾剂可以显著改善 rHV2的鼻腔吸收,提高其鼻腔给药的生物利用度,有望成为水蛭素鼻腔给药的有效制剂。

## References

- [1] Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug [J]. Thromb Res, 1994, 74: 1 - 23.
- [2] Talley JD. Cardiology commentary and update: Hirudin [J]. J Arkansas Med Society, 1995, 91: 445 - 446.
- [3] Yan XY, Zhang XN, Zhang Q. Absorption of recombinant hirudin in rats GI tract [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2004, 39: 77 - 80.
- [4] Griebach U, Sturzebecher C, Markwardt F. Assay of hirudin in plasma using a chromogenic thrombin substrate [J]. Thromb Res, 1985, 37: 347 - 350.
- [5] Chandler SG, Illum L, Tomas NM. Nasal absorption in rats. II effect of enhancers on insulin absorption and nasal histology [J]. Int J Pharm, 1991, 76: 61 - 70.
- [6] Ishikawa A, Hafter R, Seemuller U, et al. The effect of hirudin on endotoxin induced disseminated intravascular coagulation (DIC) [J]. Thromb Res, 1980, 19: 351 - 358.
- [7] Groesch H, Damm D, Youssdi RB, et al. Comparison of two different methods for the determination of rDNA-hirudin in plasma samples: HPLC vs a chromogenic thrombin substrate [J]. Thromb Res, 1991, 64: 273 - 277.
- [8] Lu L, Wang CY, Han GZ, et al. Experimental studies on antithrombosis and preventing disseminated intravascular coagulation (DIC) of recombinant hirudin [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2002, 37: 707 - 709.
- [9] Li HY, Zhang FR, Wu LJ, et al. Pharmacokinetics of artemibenzoate in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1995, 30: 422 - 427.
- [10] Richter M, Cyranka U, Nowak G, et al. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-hirudin in rats and dogs [J]. Folia Haematol (Leipzig), 1988, 115: s64 - s69.
- [11] Raake W. Antithrombotic action of recombinant hirudin in a venous thrombosis model [J]. Haemostasis, 1991, 21: 127 - 132.