文章编号:1000-5404(2013)12-1225-04

论著

新型免疫抑制剂J2纳米混悬液结膜下注射后在兔外周血及眼内的分布

郭惠玲[1,2],杜改萍[1],胡莲娜[2],王大江[1],王丽强[1],黄一飞[1] (100853 北京,解放军总医院眼科[1];100101 北京,解放军306医院眼科[2])

[摘要] **目的** 观察新型免疫抑制剂J2-NS兔结膜下注射后在外周血及眼内组织的分布。**方法** 8~12周龄健康成年新西兰白兔18只(36眼),结膜下注射J2-NS,分别于注药后1、3 d,1、2、3、4周后取角膜、房水、虹膜以及外周血,HPLC法检测组织内的药物浓度($n=6$),并使用WinNonlin药代动力学软件计算主要的药代动力学参数。**结果** J2-NS兔结膜下注射后,观察期内在组织中均可检测到药物浓度。1 d到4周内血清药物浓度为(11.19±0.33)~(13.23±0.84)ng/mL;眼部组织中角膜的药物浓度最高,而在房水和虹膜内的药物浓度较低。在角膜内,1 d到4周内药物浓度为(5.72±1.67)~(11.86±4.35)ng/mg,峰浓度(Cmax)为11.861 3 ng/mg,达峰时间(Tmax)为1 d,曲线下面积(AUC)为201.561 5 ng/(mg·d),半衰期($T_{1/2}$)达45 d。**结论** 新型免疫抑制剂J2-NS在结膜下单次注射后药物主要分布于外周血及角膜内,且在长时间能够维持有效药物浓度。

[关键词] J2;纳米混悬液;药代动力学
[中图法分类号] R322.91;R969.1;R976 [文献标志码] A

Distribution of a novel immunosuppressant J2 nano-suspension in peripheral blood and eyes in rabbits after subconjunctival injection

Guo Huiling[1,2], Du Gaiping[1], Hu Lianna[2], Wang Dajiang[1], Wang Liqiang[1], Huang Yifei[1] ([1]Department of Ophthalmology, General Hospital of PLA, Beijing, 100853; [2]Department of Ophthalmology, No. 306 Hospital of PLA, Beijing, 100101, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the distribution of a novel immunosuppressant, J2 nano-suspension (NS), in the peripheral blood and intraocular tissues in rabbits after subconjunctival injection. **Methods** Totally 18 healthy New Zealand white rabbits (36 eyes), 8- to 12-week-old, were given an subconjunctival injection of 0.2 ml 1% J2-NS. Drug concentration in the cornea, aqueous humor, and iris (6 eyes in each time point) and peripheral blood was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) on the days 1 and 3, and the weeks of 1, 2, 3 and 4 respectively after injection. The main pharmacokinetic parameters were calculated by pharmacokinetic software, WinNonlin. **Results** J2-NS at different concentrations was found in all detected organs during the observation period after injection. The serum concentration of J2-NS was 11.19±0.33 to 13.23±0.84 ng/mL from the day 1 to week 4 after injection. The cornea had the highest dose in all the eye tissues, but it was at lower dose in the aqueous humor and iris. The concentration was 5.72±1.67 to 11.86±4.35 ng/mg in the cornea from the day 1 to week 4 after injection, with Cmax of 11.861 3 ng/mg, Tmax of 1 d, and area under curve (AUC) of 201.561 5 ng/(mg·d) and $T_{1/2}$ of 45 d. **Conclusion** Single subconjunctival injection of J2-NS leads the drug mainly being distributed in the peripheral blood and cornea, and being maintained at the effective drug concentration for a long time.

[**Key words**] J2; nano-suspension; pharmacokinetics

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (30973245) and the General Program of Postdoctoral Science Foundation of China (20100481481). Corresponding author: Huang Yifei, Tel: 86-10-66936834; email: 301yk@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30973245);全国博士后科学基金面上项目(20100481481)
[通信作者] 黄一飞,电话:(010)66936834, E-mail:301yk@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130530.0838.012.html(2013-05-30)

小分子化合物J2是有我国自主知识产权的新型免疫抑制剂,分子式为$C_{18}H_{16}BN_4O_3$,相对分子质量为336。J2可以与CD4分子的第1功能区结合,竞争性抑制其与主要组织相容性抗原(major histocompatibility complex,MHC)Ⅱ类分子结合,干扰$CD4^+$T细胞对组织相容性抗原的识别[1]。眼部是免疫性疾病好累及器官,将其应用于眼组织还属首次,选择适当的眼部给药系统,不仅可以提高药物的靶向性、延长药物作用时间、增强药物疗效、提高眼部生物利用度,还可以减少全身的不良反应,为了增进J2的溶解和促进局部吸收,我们将其设计为缓释制剂——纳米混悬液(nanosuspension, NS),并对其在眼部应用的实用性和可行性进行考察。本研究应用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC)测定其在眼内及血液组织的药物浓度、药代动力学分布特点,为进一步体内给药方式、给药频率等提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

8~12周龄健康成年新西兰白兔18只(36眼),体质量1.5~2.5 kg,雌雄不限,由解放军总医院实验动物中心提供。采用随机数字表法随机抽样,分别于用药后1、3 d,1、2、3、4周等6个时间点各处死3只取材。

1.2 实验试剂

速眠新-Ⅱ注射液(吉林省长春市兽药公司);肝素(江苏万邦生化医药股份有限公司);金霉素眼膏(上海通用药业有限公司);J2-NS(军事医学科学院王晓奎博士提供);甲酸(分析纯北京化学试剂公司);乙腈(色谱纯 J&K Chemical LTD);超纯水(Milli-Q Reagent Water System,美国)。

1.3 实验仪器及设备

精密电子天平(Sartorius BP121S,德国);液相色谱-质谱联用仪(LC-MS/MS):3级4极杆串接LC-MS/MS (Thermo Finnigan™ TSQ Quantum Discovery MAX Finnigan,美国);色谱柱[TOSOH (100 mm×2.0 mm,T-211, Rev. 1.0),日本];旋涡混合器(XW-80A,上海青浦沪西仪器厂,中国);高速冷冻离心机(Thermo Micro CL 21R,德国);倒置显微镜(OLYMPUS,日本);眼科手术器械(有齿镊、剪刀、纹氏钳,苏州六六视觉科技股份公司);手术显微镜(Muller-Wedel, 德国)。

1.4 给药方法及样品采集

实验兔速眠新-Ⅱ注射液0.1 mL/kg,肌肉注射麻醉,常规消毒铺巾,生理盐水冲洗结膜囊,显微镜下右眼上方结膜下注射1% J2-NS 0.2 mL,金霉素眼膏涂眼。注药完毕后定期使用裂隙灯观察眼部情况。分别于注药后各时间点随机抽取3只,耳缘静脉抽取全血3~5 mL,肝素抗凝,1 400×g离心6 min,取上清。耳缘静脉空气栓塞法处死实验兔,生理盐水冲洗眼球,1 mL注射器快速抽取房水,沿角巩膜缘剪除角膜,将虹膜组织完整拽出,滤纸快速吸干,放入EP管中,置于-80 ℃冰箱保存,待测。

1.5 样品处理方法

1.5.1 房水、血清样品处理 取房水或血清50 μL,加入50 μL乙腈,内标液100 μL振荡混匀3 min,21 000×g离心10 min,取上清液100 μL,置于高效液相色谱仪中分析,测定样品中药物浓度。

1.5.2 角膜、虹膜样品处理 精密称重角膜、虹膜,将组织剪碎碾磨,加入BSS 500 μL,超声20 min使药物析出,取出混悬液50 μL,加入50 μL乙腈,内标液100 μL振荡混匀3 min,21 000×g离心10 min,取上清液100 μL,置于高效液相色谱仪中分析,测定样品质量浓度。计算药物量后除以原质量即得药物在样品中的含量。

1.6 J2药物含量测定方法——HPLC-MS/MS测量方法的建立

1.6.1 标准溶液的配制 精密称取J2对照品10.2 mg至10.20 mL乙腈中,超声2 min ,使其充分振荡,溶解完全,配成1 mg/mL J2的对照品储备液,置于-4 ℃密封保存。内标用乙腈配制稀释成2 000 ng/mL工作液, -4 ℃保存。

1.6.2 HPLC-MS/MS检测仪器 由Finnigan Surveyor LC泵、Surveyor AS自动进样器、电喷雾离子化电离源(ESI)及3级串联质谱组成,控制软件为Xcalibur1.4,质谱数据分析采用Lcquan2.0数据处理系统。

1.6.3 HPLC/MS/MS分析条件 为Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX,离子化方式为电喷雾(ESI)条件,氮气喷雾压力31 psi,喷雾电压4 500 V,氩气压力20 psi,温度300 ℃,Source CID 24。J2和内标检测的m/z分别为337.2、285.1。选择性离子(SRM)方式检测m/z 337.2的碎片离子为m/z 115.15;m/z 285.1的碎片离子为m/z 138.0。色谱条件为:色谱柱(TSKgel Amide-80 2.0×100 mm,5 μm),流动相:含0.1%甲酸的乙腈:水=60:40(v/v);流速0.2 mL/min;柱温25 ℃, 进样体积:10 μL。

1.6.4 标准曲线的绘制 在空白角膜、房水、虹膜、血清中加入不同量的J2标准溶液,配制成相当于质量浓度分别为10、20、100、500、1 000、2 000 ng/mL的空白组织匀浆样品,按“1.5样品处理方法”处理,进样,最低定量限为10 ng/mL。以峰面积Y对各组织中浓度X(ng/mL)进行线性回归分析,得线性回归方程,制标准曲线。

1.6.5 精密度试验 日内差:取J2标准溶液100、500、1 000 ng/mL,于1 d内不同时间测定5次,记录浓度,计算标准差。日间差:取J2标准溶液100、500、1 000 ng/mL,于5 d内不同时间测定5次,记录浓度,计算标准差。

1.6.6 回收率试验 精密抽取空白NS 1 mL于10 mL容量瓶,分别加入2 000 ng/mL标准液0.1、0.2、0.3 mL各5份,加入乙腈至刻度,超声20 min,离心取上清测定药物浓度,以测定浓度与配置浓度之比计算回收率。

1.7 统计学方法

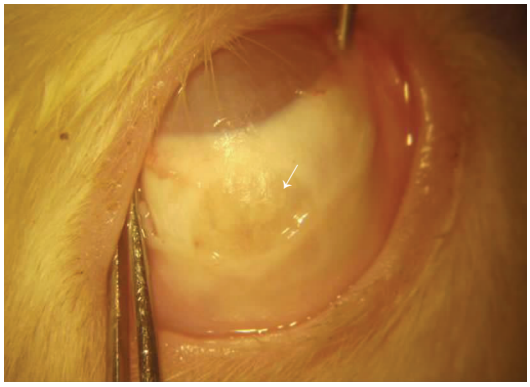
采用SPSS 13.0统计软件对实验数据进行统计学分析,所

有测量指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用 WinNonlin 药代动力学处理系统处理实验数据,计算主要的药代动力学参数。

2 结果

2.1 兔眼注射药物后大体观察

18 只实验兔(36 眼)注射后,可见上方结膜穹窿部注射部位药物集聚,部分兔睁眼略受限,次日好转,注药期间无明显眼部并发症(图 1)。



↑:示注药部位轮廓

图 1 J2-NS 结膜下注射 4 周后兔眼大体观察

2.2 方法特异性

在本实验条件下,J2 和内标有较高的质谱响应和较好的分离度。J2 和内标保留时间分别为 1.0、1.5 min 左右,说明该方法专属性较好。

2.3 线性及定量下限

标准曲线:J2 标准品浓度 50 ~ 2 000 ng/mL 范围内,峰面积对浓度的线性回归方程为:Y = -0.000 939 903 + 5.447 83e - 005X,R^2 = 0.999 8,W:1/X,在此浓度范围内线性关系良好。

2.4 精密度与回收率

日内差和日间差及回收率检测结果 RSD 分别为 9.32% 和 12.50%,说明实验精密度良好,回收率结果符合测定要求。

2.5 标准工作曲线

J2 标准品浓度以峰面积 Y 对浓度 X 进行回归,在 50 ~ 2 000 ng/mL范围内与峰面积有良好的线性关系。

房水样品测定的标准工作曲线方程为:Y = -0.000 488 593 + 0.000 451 725X, R^2 = 0.997 9, W: 1/X。

角膜样品测定的标准工作曲线方程为:Y = -0.000 132 434 + 8.960 95e - 005X,R^2 = 0.999 9, W: 1/X。

虹膜样品测定的标准工作曲线方程为:Y = -6.740 97e - 005 + 9.960 28e - 005X,R^2 = 0.997 0, W: 1/X。

血浆样品测定的标准工作曲线方程为:Y = -0.003 381 64 + 0.000 310 772X, R^2 = 0.998 6, W: 1/X。

2.6 J2-NS 结膜下注射后在眼组织及血液中的药物浓度

J2-NS 兔结膜下注射后,观察期内在组织中均可检测到药物浓度(表 1),药物释放均匀,全血中可以检测到药物浓度,眼部组织中角膜的药物浓度最高,在房水和虹膜内的药物浓度较低。在角膜内药物半衰期达 45 d,峰浓度为 11.861 3 ng/mg(表 2)。

表 1 HPLC-MS/MS 法测定兔结膜下注射 J2-NS 后各时间点组织的药物浓度 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

时间	血清(ng/mL)	角膜(ng/mg)	房水(ng/mL)	虹膜(ng/mg)
1 d	11.19 ± 0.33	11.86 ± 4.35	1.14 ± 0.03	0.06 ± 0.01
3 d	11.60 ± 1.05	6.76 ± 1.58	1.17 ± 0.05	0.10 ± 0.02
1 周	12.16 ± 1.04	9.17 ± 0.64	1.13 ± 0.04	0.10 ± 0.02
2 周	13.23 ± 0.84	6.90 ± 1.09	1.22 ± 0.14	0.03 ± 0.01
3 周	12.64 ± 2.07	5.72 ± 1.67	1.26 ± 0.24	0.05 ± 0.01
4 周	11.58 ± 0.81	7.07 ± 3.59	1.21 ± 0.17	0.06 ± 0.01

表 2 兔结膜下注射 J2-NS 后角膜药代动力学参数

主要参数	数值
Lambda_z(1/d)	0.015 363 859
t1/2(d)	45.115 434 56
Tmax(d)	1
Cmax(ng/mg)	11.861 3
Clast_obs/Cmax	0.595 997 066
AUC 0-t[ng/(mg × d)]	201.561 5
MRT 0-inf_obs(d)	68.722 956 55

3 讨论

据统计,目前至少有 40% 的药物因溶解度问题而致使用受到限制,在《美国药典》中有 1/3 以上的药物为难溶性药物。因此,提高难溶性药物的溶解度和生物利用度一直是药剂学研究的主要工作内容之一[2]。J2 是通过计算机辅助药物设计方法获得的小分子化合物,以往实验已证实 J2 在抗免疫排斥方面有较好的药效和较高的生物利用度[3-4],在角膜移植动物模型中也显示了较好的抗免疫排斥作用[5-8],但是它仍存在有高通量筛选药物普遍存在的溶解度小、生物利用度低等问题。我们根据 J2 的理化性质以及眼部药物的代谢特点最终选用 NS 作为眼部给药系统。NS 是通过粉碎或者控制析晶技术、以表面活性剂为助悬剂,将药物颗粒分散在水中形成的稳定地胶态体系,可极大地提高药物的溶解度和溶出速率[9]。与传统意义上的基质骨架型纳米体系不同,它无需载体材料,降低了给药体积,且处方中表面活性剂的含量很少,避免了有机溶剂的使用[10]。另外,NS 制作工艺简单,适用于大规模生产,因此被认为是目前解决难溶性药物溶解和吸收问题的最好方法[11]。眼科药物也广泛采用纳米技术作为眼部递药系统的新途径[12-14],本实验在 J2-NS 的制备过程中,通过加入适当的辅料,优化制剂处方,使其在 pH 值、渗透压、微生物等方面符合国际眼用制剂标准。

在新药的研究实验中,药代动力学研究占有非常重要的地位。通过眼部药代动力学的研究,我们可以

获得药物在眼部代谢的浓度-时间曲线,了解药物在眼内的代谢特征,指导临床用药时的给药剂量、间隔、途径及剂型等,保证药物疗效,减少毒副作用[15]。虽然现代科技的发展为药代动力学的研究提供了多种手段,但由于眼部解剖和生理复杂、组织不易取材、局部药物浓度低等原因[16],增加了眼科药代动力学研究的复杂性和困难性,所以到目前为止尚没有一种方法能够完全模拟和检测药物在眼内的代谢[17-18]。目前生物样品的药代动力学分析一般首选色谱法,包括高效液相色谱法(HPLC),气相色谱法(GC)和色谱-质谱联用法(如 LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS 方法)等,这类方法灵敏度、特异性、准确性一般都能满足临床药代动力学研究的需要,多数实验室也具备条件,因此应用最广。实验中通过 HPLC-MS/MS 法对 J2-NS 局部用药后药代动力学特点进行初步的探讨,结果证实,J2-NS 在体内一次给药后可以很好地维持药物浓度,局部组织中角膜浓度明显高于其他组织浓度,用药后第 1 天可达到峰浓度(11.86 ± 4.35) ng/mg,高于体外实验的起效浓度[3]。另外,J2-NS 的半衰期长达 45 d,利于其在靶部位药效的发挥、减少给药频率、降低全身毒副作用、提高患者的治疗顺应性。房水和虹膜的药物浓度低,可能与眼的生物膜屏障,尤其血-眼屏障(血-房水屏障、血-视网膜屏障)有关,也可能和药物本身的溶解度低有关。在实验中,除了 J2-NS 在给药第 1 天出现较高的角膜浓度外,其余时间点取材的组织和血液中,药物浓度基本保持平稳,没有明显突释。由于 J2-NS 粒径小,给药体积小,实验中使用 40G 针头给药,容易推注,方便控制给药剂量,且其对粘膜有良好的粘附作用,这些特点均有利于其今后在眼科临床中广泛使用。

体内实验可以更加直观地了解局部给药后药物在眼组织吸收、分布、代谢规律,对了解新型眼部给药系统的疗效、给药间隔和毒性有重要的参考价值。综上,J2-NS 作为眼部缓释剂型局部注射后可以在靶组织维持长期稳定的药物浓度,利于药效的发挥和减少给药频率。

参考文献:

[1] Li S, Gao J, Satoh T, *et al*. A computer screening approach to immunoglobulin superfamily structures and interactions: discovery of small non-peptidic CD4 inhibitors as novel immunotherapeutics [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(1): 73-78.

[2] 马世堂, 刘培勋, 徐阳, 等. 难溶性药物增溶研究进展[J]. 医药导报, 2009, 28(8): 1052-1054.

[3] Xiao H, Zhang H, Yu Z Y, *et al*. J2 prolongs the corneal allograft survival through inhibition of the CD4 + T cell-mediated response *in vivo* [J]. Transpl Immunol, 2007, 18(2): 130-137.

[4] Xiao H, Feng J N, He X H, *et al*. Potent inhibition of the CD4$^-$ dependent T cell response by J2, a novel nonpeptide organic ligand of CD4 D1 [J]. Mol Immunol, 2007, 44(5): 784-795.

[5] 宋静, 郭惠玲, 王大江, 等. 原子力显微镜观测小分子化合物 J2 对大鼠角膜移植术后内皮细胞膜表面的影响[J]. 中华眼科杂志, 2011, 47(5): 404-409.

[6] Wang D J, Zhang H, Chen G J, *et al*. Further study on molecular biological effects of CD4 D1 inhibitor J2 on allografts following corneal transplantation in mice [J]. Scientific Research and Essay, 2010, 5(1): 63-70.

[7] 王大江, 郭惠玲, 黄一飞, 等. 新型免疫抑制剂 J2 对角膜移植小鼠淋巴细胞中白细胞介素 10 及干扰素 γ 分泌的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(31): 5797-5800.

[8] 王大江, 黄一飞, 郭惠玲, 等. 以 CD4 为靶点的小分子化合物 J2 对异基因角膜移植小鼠淋巴细胞的影响[J]. 眼科研究, 2010, 28(8): 750-754.

[9] 王胜峰, 姚瑶, 丁劲松. 药物纳米混悬剂的形成与维持方法研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(10): 1257-1259.

[10] Singh S. Nanomedicine-nanoscale drugs and delivery systems[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2010, 10(12): 7906-7918.

[11] 金丽霞. 纳米药物载体的研究及临床应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(8): 1429-1432.

[12] Wadhwa S, Paliwal R, Paliwal S R, *et al*. Nanocarriers in ocular drug delivery: an update review [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(23): 2724-2750.

[13] Khan M S, Vishakante G D, Bathool A. Development and characterization of pilocarpine loaded Eudragit nanosuspensions for ocular drug delivery[J]. J Biomed Nanotechnol, 2013, 9(1): 124-131.

[14] Sultana Y, Maurya D P, Iqbal Z, *et al*. Nanotechnology in ocular delivery: current and future directions [J]. Drugs Today (Barc), 2011, 47(6): 441-455.

[15] Gaudana R J, Ananthula H K, Parenky A, *et al*. Ocular drug delivery[J]. AAPS J, 2010, 12(3): 348-360.

[16] Barar J, Javadzadeh A R, Omidi Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(5): 567-581.

[17] Kesavan K, Balasubramaniam J, Kant S, *et al*. Newer approaches for optimal bioavailability of ocularly delivered drugs: review [J]. Curr Drug Deliv, 2011, 8(2): 172-193.

[18] Barot M, Bagui M, Gokulgandhi M R, *et al*. Prodrug strategies in ocular drug delivery [J]. Med Chem, 2012, 8(4): 753-768.

(**收稿**:2013-04-12;**修回**:2013-05-10)

(编辑 栾 嘉)