

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱

超氧化歧化酵素之劑型設計

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：90-PH-09

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

計畫主持人：陳俊仁副教授

共同主持人：駱雨利副教授

執行單位：嘉南藥理科技大學藥學系

中華民國 91 年 2 月 25 日

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

## 超氧化歧化酵素之劑型設計

### Dosage Form Design of Superoxide Dismutase

計畫編號: 90-PH-09

執行期限: 90年1月1日至90年12月31日

主持人: 陳俊仁副教授 嘉南藥理科技大學藥學系

共同主持人: 駱雨利副教授

#### 一、中文摘要

有越來越多的研究報告證明自由基 (free radicals) 在許多疾病的發生與惡化中扮演重要角色，亦是造成許多疾病的罪魁禍首。若將自由基清除或將它的作用阻止的話，便可改善及防止許多疾病的產生。因此超氧化歧化酵素 (superoxide dismutase; SOD) 存在於體內便有其必要性。

SOD 本身為一種抗氧化酵素，易被胃酸或腸內蛋白質分解破壞，故在體內的半衰期非常短。所以為了增加 SOD 在血中的循環時間，故將 SOD 以不同的脂質混合物 (lipid mixture) 製成微脂粒 (liposomes)，並以此微脂粒來做為載體 (carriers)，以增加 SOD 的血中的作用時間。

SOD 本身亦屬於蛋白質製劑，因而採取冷凍乾燥法 (lyophilization) 將其製成固體劑型，以增加儲存時的安定作用。SOD 微脂粒劑型於冷凍液晶乾燥處理後依 SOD 生物活性決定之包埋率略有下降。下降程度依不同配方而有明顯差異。利用加速安定性試驗得知部份 SOD 微脂粒之冷凍液晶乾燥劑型可維持 60% 之 SOD 包埋率至少五週。濁度測定顯示這些冷凍液晶乾燥劑型至少可維持五週安定性。

關鍵詞：超氧化物歧化酵素、微脂粒、包埋率、濁度

#### Abstract

Free radical-mediated injury is the cause of a long list of diseases. The antioxidant enzymes convert these free radicals to less reactive or non-toxic molecules. Superoxide dismutase (SOD) converts  $O_2^-$  to  $H_2O_2$ . In this study, we aim to develop stable lyophilized SOD liposome dosage forms to keep long-term activity. We found that after lyophilization, the entrapment efficiency of SOD liposomes was slightly decreased. Part of these lyophilized SOD liposome dosage forms kept entrapment efficiency of 60% for at least 5 weeks. Turbidity tests also demonstrated that these formulations were stable for at least 5 weeks

Keywords: superoxide dismutase; liposomes; entrapment efficiency; turbidity

#### 二、緣由及目的

有越來越多的研究報告證明 free radicals 在許多疾病的發生與惡化中扮演重要角色，主要相關的疾病有：動脈粥狀硬化、癌症、缺血、發炎、幅射傷害、汙染物傷害以及老化等。如果 free radicals 確實是造成多種疾病的罪魁禍首，那麼將 free radicals 清除或將它的作用阻止的話，多種疾病的防止或改善就有可能。同理，人類的兩種最大的死因—動脈粥狀硬化及癌症，與體內 free radicals 大量增生有

關，它們可由適當的抗氧化劑來預防與改善。

自由基與細胞膜內不飽和脂肪酸作用所產生的過氧化脂質自由基，會使細胞膜的結構嚴重的受到破壞，使細胞膜喪失流動性，細胞膜的分泌功能與內外離子濃度差均發生異常，嚴重傷害細胞膜的正常生理功能，除脂肪外，酵素蛋白質如果受到自由基的氧化破壞，酵素的作用力則會喪失；碳水化合物受到自由基的破壞，會喪失聚合的能力；核酸受到自由基的傷害，DNA 會發生斷裂或跨接，抑制蛋白質、核酸和脂肪的合成，甚至使細胞產生突變。

超氧化物歧化酵素 (superoxide dismutase; SOD) 存在於體內有其必要性，這是不容置疑的，它是清除超氧陰離子 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 的要角。所以為了增加 SOD 在血中循環的時間，可用不同的 Lipids 如 cholesterol、phosphatidylcholines、stearylamine 與 SOD 藕合，來增加分子量以延長在血液循環中的時間，此種將 SOD 包入 Liposomes 內可使半衰期由六分鐘變成 4.2 小時，因此 SOD 需有 liposomes 來做載體 (carriers)。一般牛血清紅血球的 Cu,Zn-SOD，等電點為 4.95，因此在人體的 pH 值下帶負電荷，故可與陽離子性 liposomes 藉由靜電荷的吸引而將大量的 SOD 包入 liposomes 內。

### 三、結果及討論

SOD 是一種除去對體內組織有害的活性氧 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 的酵素，SOD 於體內的半衰期只有 5~6 分短暫時間，為此設計具有安定性及持續性之 drug delivery system (DDS) 製劑，因此將其製成包在微脂粒中的冷凍乾燥劑型。使其身體可利用率顯著上昇，藥效之適用範圍也擴大。

平時細菌或異物侵入身體一再刺激時，或某種農藥、殺蟲劑等之化學物質(環

境污染等)侵入身體時，即造成過剩之活性氧在身體產生，於是身體組織被融解而受害，由這些活行氧障害所引起之疾病有血管病變、腦中風、心肌梗塞、癌症之誘發 (promotor) 等，包括動脈硬化在內之廣範圍的身體老化均由活性氧促進，由皮膚黑色素 (melanin) 之形成所導致的黑斑 (肝斑)、雀斑、皺紋等皮膚老化現象也同時被活性氧促進，又 SOD 活性由壯年期進入老年期將逐漸低下，換言之，SOD 活性之增減，乃是決定身體老化、癌化之主因。

下面來討論  $O_2^{\cdot -}$  及 SOD 作用機制與臨床功效：

#### 1. 老化：

在生化界已有許多科學家證實自由基是促進生物體老化的一個主要原因，自由基不斷地破壞細胞的組成，使生物體內的小組織與器官的功能逐漸減弱，縮短了生物體的壽命。

#### 2. 動脈硬化：

1952 年 Glavind 就發覺動脈硬化程度與過氧化脂質有正面的關係。動脈硬化程度越高，過氧化脂質越上昇。最近報告更顯示  $O_2^{\cdot -}$  與動脈粥狀硬化斑 (atherosclerotic plaques) 的形成有關。我們都知道血液中低密度脂蛋白 (LDL) 是促成動脈粥狀硬化最活躍的脂肪，動脈血管壁下的內皮組織所沈積的 LDL 與  $O_2^{\cdot -}$  作用，產生過氧 LDL，傷害內皮細胞，同時吸引吞噬細胞 (macrophage)，前來聚集，吞噬細胞會釋出  $O_2^{\cdot -}$ ，繼續再對內皮細胞產生傷害使動脈硬化程度更高。這也就是為什麼血液中白血球數量增多，會增加心肌梗塞與中風的機會。

#### 3. 腦血管障害：

腦缺血 (brain ischemia) 所引起對腦部的傷害主要是由於血液受干擾的結果所引

起。換句話說，是因為腦部缺氧然後又充氧的結果(缺血 ischemia / 再充血 reperfusion)。大部份有氧組織如果經過缺血/再充血的過程都會受到傷害。最近研究顯示這類的傷害幾乎完全發生在再充血的時期，而且是因為  $O_2^{\cdot-}$  所引起。因此利用  $O_2^{\cdot-}$  的清除劑 SOD 來預防及治療腦血管障害是有相當大的意義的。

#### 4. 糖尿病:

糖尿病患者血液中過氧化脂質上昇，容易引起血管障礙的併發症已是不爭的事實。I 型糖尿病(對胰島素依存性糖尿病)  $\beta$  細胞受到破壞，無法排除  $O_2^{\cdot-}$ 。在動物實驗中，若先使用 SOD，可防止誘發性的糖尿病發作。

#### 5. 消化器官的疾病:

消化器官常會接觸到外來的物質以及毒物等，微血管容易受到傷害，影響內臟的功能，自由基與消化器官的疾病有相當大的關連。臨床上已逐漸重視自由基與虛血性腸炎、潰瘍性腸炎、慢性迴腸炎、幅射線照射引起的腸炎等的密切關係。以及因  $CCl_4$  代謝後會產生  $O_2^{\cdot-}$ ，且  $CCl_4$  的毒性在於對肝臟的毒性，引起脂肪肝及肝硬化。自由基有相當大的氧化能力，它使細胞膜的脂肪(lipid)組織產生過氧化(peroxidation)，使細胞膜功能變化，產生各種病變，導致脂肪肝、肝硬化及肝癌。很多毒性化學物都有產生自由基的性質， $CCl_4$  只是其中一種。而自由基是主要的罪魁禍首，SOD 對這些疾病的改善有相當大的價值。

#### 6. 發炎性疾病:

愈來愈多的證明顯示，由吞噬細胞或體內其它來源產生的  $O_2^{\cdot-}$  是構成發炎性疾病的病因。發炎時，吞噬細胞在發炎部位聚集，進行吞噬作用以消滅病菌，釋出

大量的  $O_2^{\cdot-}$ ， $O_2^{\cdot-}$  直接傷害細胞，或改變細胞組織結構蛋白的生化及生理功能，使發炎症狀惡化。風濕性關節炎具有許多自由基傷害的特徵。自由基直接破壞軟骨細胞，使軟骨變質及腐蝕。同時，自由基與關節的潤滑液作用，使潤滑液黏度降低喪失應有的潤滑能力。

細胞的代謝會產生自由基和過氧化物，而我們體內幸好有 SOD 及 catalase 等酵素可以保護我們，把  $O_2^{\cdot-}$  及  $H_2O_2$  消除掉，不然  $O_2^{\cdot-}$  立即可以攻擊 DNA 引起傷害；可是如果我們細胞內  $O_2^{\cdot-}$  或  $H_2O_2$  太多的話，或是 SOD 及 catalase 不夠的話，許多疾病就會產生；因為除了 DNA 外，它們亦會和脂肪、碳水化合物及蛋白質等細胞主要物質作用，造成傷害。同樣地，如果我們有製劑如藥物之類可以增進這些藥物的能力，或可以消除  $O_2^{\cdot-}$  的話，用它來治病是有理論根據的。此外，污染物、藥物、毒物等在體內亦會產生自由基和過氧化物，使身體沒有辦法對付，而必需藉助於外來的抗氧化物來保護健康。

Liposomes 的構造為一種含有一層或多層水相隔開之脂質雙層的同心球體結構。同時具有親水性端及厭水性端的脂質所構成，脂雙層是厭水性端相對向裡面，而親水性端面向水溶性，恰似細胞膜。厭水性的藥品可以嵌入脂雙層中，而親水性藥品則可以包覆在 Liposome 裡的水溶性層中，因此 Liposome 可同時作為厭水性及親水性藥品的載體(carrier)。

生物製劑(protein / peptide)處方設計時，常常採取冷凍乾燥法。SOD 微脂粒劑型於冷凍液晶乾燥處理後依 SOD 生物活性決定之包埋率略有下降。下降程度依不同配方而有明顯差異。利用加速安定性試驗得知部份 SOD 微脂粒之冷凍液晶乾燥劑型可維持 60% 之 SOD 包埋率至少五週。濁度測定顯示這些冷凍液晶乾燥劑型

至少可維持五週安定性。

另外，在冷凍乾燥過程中，加入凍晶保護劑來保護 SOD，以防止 SOD 在冷凍乾燥的過程中被破壞掉。此部份研究將在後續的計劃中繼續探討。

#### 四、計畫成果自評

在應用價值方面，本計畫評估冷凍液晶乾燥法處理之 SOD-liposomes 液晶粉末劑型，其蛋白質成份 SOD 之活性之變化，並試圖瞭解與媒液重新混合之 SOD-liposomes 液晶粉末之 SOD 活性及微脂粒包埋率之變化。最重要地是後續將比較加入液晶乾燥安定劑對於 SOD-liposomes 之藥品安定性之影響。此部分實驗將提供臨床發展長效之固態超氧化歧化酵素微脂粒劑型之依據。

在學術價值方面，在這個研究計畫中，藉由不同磷脂質劑型與 SOD 之交互作用之研究，我們已建立適當之 SOD 活性分析之模型並期望能研發出更多超氧化歧化酵素之穩定劑型，進而提高抗氧化療法的成功率。

本篇成果報告僅節錄初步超氧化歧化酵素冷凍液晶乾燥微脂粒劑型的結果。綜合其它不同物理之結果，將可得到全面性之結論。這些結果目前已在整理階段，將發表於學術期刊上，並亟具有臨床應用之遠景。

#### 五、參考文獻

- 1.SOD(Superoxide dismutase)與生藥之生體可利用率(一).藥學雜誌第五卷第一期；p88~96.蕭振亞、林正弘、蕭凱鴻。
- 2.Superoxide dismutase 醫療功效.臺灣醫界 34 卷第二期；p55~61.黃洋中。
- 3.對 SOD 治療功效的探討.臺灣醫界 35 卷第十一期；P64~66.胡淼琳。
- 4.Clinical pharmacokinetics and delivery of bovine superoxide dismutase. Clin

pharmacokinet 1998 30 : 17-25.

- 5.High-efficiency entrapment of superoxide dismutase into cationic liposomes containing synthetic aminoglycolipid. Chem Pharm Bull(Tokyo) 1999 47 : 1327-1331.

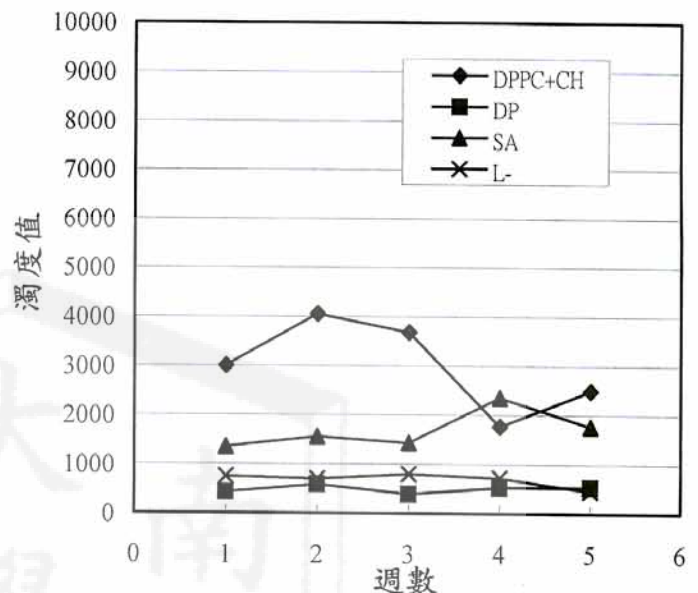


Fig. 1 Turbidity of SOD-liposomes in five weeks.

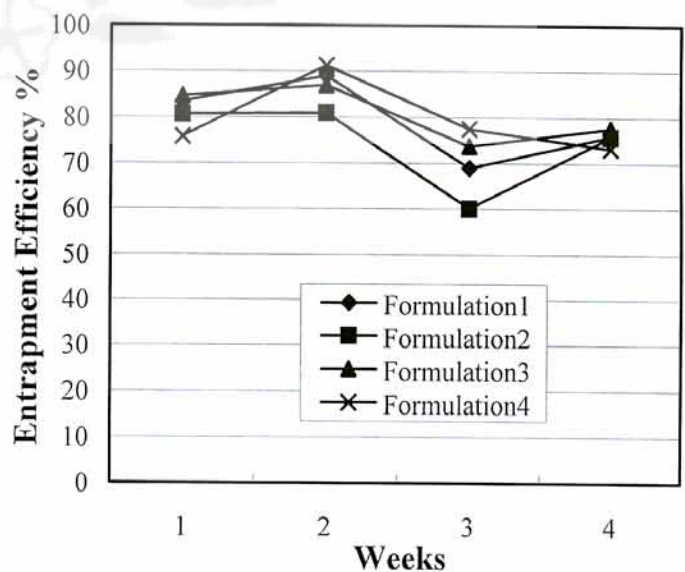


Fig. 2 Entrapment Efficiency % of SOD-liposomes in five weeks.