

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 3 月 19 日 (19.03.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/052457 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 9/06 (2006.01) **A61K 38/44** (2006.01)

A61K 47/38 (2006.01) **A61P 19/06** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/103968

(22) 国际申请日: 2019 年 9 月 2 日 (02.09.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811065580.7 2018 年 9 月 13 日 (13.09.2018) CN

(71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。

(72) 发明人: 陈建华 (CHEN, Jianhua); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。黄秀华 (HUANG, Xiuhua); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。王霞 (WANG, Yuxia); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。

(74) 代理人: 南京苏高专利商标事务所 (普通合伙) (NANJING SUGAO PATENT AND TRADEMARK FIRM (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江苏省南京市白下区中山东路 198 号龙台国际大厦 1912 室, Jiangsu 210005 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(54) Title: URICASE GEL PREPARATION FOR EXTERNAL USE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种尿酸酶外用凝胶制剂、其制备方法及其用途

(57) Abstract: A uricase gel preparation for external use, which is composed of the following components in percentage by weight: greater than 0 and less than or equal to 1.0% of uricase, 0.05-20% of an aqueous gel matrix, 0.15-20% of a protein protectant, 2-25% of a humectant, 0.01-0.20% of a chelating agent, 0.001-3.0% of a transdermal enhancer, 0.005-0.5% of a preservative and the balance of water for injection. The pH of the preparation is adjusted to 5-10 by a pH adjuster. The method for preparing the gel preparation comprises: preparing a standby substance from some of the components; respectively formulating each of the remaining components with the water for injection; adding the preservative into the standby substance and adjusting the pH; adding the protein protectant, the uricase and the balance, the water for injection; uniformly stirring same and then subpackaging same to obtain the gel preparation.

(57) 摘要: 一种尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分按重量百分比组成: 尿酸酶大于 0 且小于或等于 1.0%, 水性凝胶基质 0.05-20%, 蛋白保护剂 0.15-20%, 保湿剂 2-25%, 螯合剂 0.01-0.20%, 透皮促进剂 0.001-3.0%, 防腐剂 0.005-0.5%, 余量为注射用水, 所述制剂的 pH 经 pH 调节剂调整为 5-10。所述凝胶制剂的制备方法包括: 以部分组分制得备用物, 分别以注射用水配制各剩余组分, 将防腐剂加入备用物, 调节 pH, 加入蛋白保护剂、尿酸酶以及余量注射用水, 搅拌均匀后分装即得。

WO 2020/052457 A1

一种尿酸酶外用凝胶制剂、其制备方法及用途

技术领域

本发明涉及一种尿酸酶外用凝胶制剂，可作为治疗高尿酸血症、痛风以及由高尿酸血症引起的疾病的药物制剂，同时还涉及该凝胶制剂的制备方法及其用途，属于生物医药制剂技术领域。

背景技术

据发明人了解，尿酸（Uric acid, UA）作为人体嘌呤代谢的最终产物，主要由肝脏、胃肠道等代谢产生，进入血液并形成尿酸代谢池。当人体内尿酸代谢发生障碍，使尿酸产生过多或排泄减少时，即形成高尿酸血症（hyperuricemia）。高尿酸血症的诊断指标通常为女性血尿酸水平大于 6mg/dl（360 μ M（M 即 mol/L，下同）），男性血尿酸水平大于 7mg/dl（420 μ M）。长期过饱和尿酸形成单钠尿酸盐结晶并沉积于关节腔内或软组织中即形成痛风石。痛风的主要临床特征为高尿酸血症，以及高尿酸血症引起的痛风反复急、慢性发作，关节炎症、关节畸形、尿酸性尿路结石，对肾脏造成损害，引发间质性肾炎、肾衰竭等。此外，血清和/或细胞内的尿酸盐可以刺激肾素-血管紧张素-醛固酮系统，诱发高血压（Johnson R J, Bakris G L, Borghi C, et al. American Journal of Kidney Diseases, 2018:851-865）；研究亦发现尿酸在糖尿病肾病、钙调神经磷酸酶抑制剂肾毒性和急性肾损伤中具有重要意义（Johnson R J, Bakris G L, Borghi C, et al. American Journal of Kidney Diseases, 2018:851-865）。痛风常伴腹型肥胖、高脂血症、高血压、II 型糖尿病及心血管病等临床表现。

血尿酸主要由肾脏、肠道、皮肤汗腺排出体外。肾脏是尿酸排泄的主要器官，尿酸能够自由透过肾小球，在近端小管重吸收和分泌，分泌的尿酸绝大部分被重吸收，只有不到 10% 被排泄，在近端肾小管的重吸收和分泌过程依赖于离子通道及相关的尿酸盐转运体。

尿酸在肠道的排泄约占日排泄量的三分之一。肠道中尿酸的转运机制尚不明确，但 GLUT9、ABCG2 将尿酸运输到肠道，肠道 GLUT9 基因敲除可引发高尿酸血症，ABCG2 基因敲除可导致高尿酸血症和“超负荷”尿酸尿症（Johnson R J, Bakris G L, Borghi C, et al. American Journal of Kidney Diseases, 2018:851-865）。

人皮肤中约含有 200-500 万个汗腺，在交感神经（自主神经）的控制下将汗液分泌到皮肤表面，避免因周围环境温度上升而导致机体温度过高以及随之而来的机体功能紊乱，为人体内外环境的平衡提供稳态。皮肤是继肺脏、肾脏、肠道之外的最主要的排泄器官，通过汗腺的排汗作用，可以将尿酸、尿素等排泄出体外，发挥着辅助或替代肾脏的功能，可被视为特殊形式的肾脏（Hanafusa N, Lodebo B T, Shah A, et al. Journal of Renal Nutrition the Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National

Kidney Foundation, 2017, 27(5):295-302.)。汗腺与肾脏的排泄作用配合非常紧密,当肾脏的排泄功能损害时,汗液中的尿素等氮代谢物含量增加,可在一定程度上补偿肾脏功能的不足。研究表明,汗液中的尿酸约 $24.5 \mu\text{M}$, 约占血尿酸 (serum uric acid, SUA) 水平的 6.3% (Huang C T, Chen M L, Huang L L, et al. Chinese Journal of Physiology, 2002, 45(3):109-115.), 尿酸通过汗腺透过皮肤屏障到达皮肤表面,为降解尿酸药物的局部给药制剂的研发提供了理论基础。

痛风是一种“富贵病”。随着生活水平的提高,中国人群中高尿酸血症及痛风的患病率逐渐增高。据统计在中国大陆,2014 年痛风的患病率为 1.4%,而 2000-2005 年痛风的患病率仅为 0.9% (Liu R, Han C, Wu D, et al. Biomed Research International, 2015, 2015(15, supplement):1-12.)。流行病学研究发现,从 1948 年国内首次发现的痛风患者开始,到 2016 年我国国内高尿酸血症患者的发病率为 10%,患者数目高达 1.35 亿,痛风患者约在 1700 万左右,已成为我国第二大代谢疾病,是继高血糖、高血脂之后的第三类富贵病 (中国人民解放军总医院. 中国药物应用与监测[M].)。

痛风治疗是一个长期的过程,除了合理减重,避免摄入酒精 (尤其是啤酒以及烈酒)、含糖饮料、暴饮暴食以及过多摄入肉类、海鲜,鼓励摄入低脂奶制品及规律运动等外,以药物治疗痛风发作在短期内具有显著的疗效,例如治疗急性痛风发作的一线药物秋水仙碱以及其它药物如非甾体抗炎药、糖皮质激素、别嘌醇等 (Benn C L, Dua P, Gurrell R, et al. Frontiers in medicine, 2018, 5:160-188.)。但对于体内证实有尿酸盐晶体、严重慢性痛风石以及累及生活质量的痛风患者,即使采用最大剂量降尿酸药物 (包括联合用药) 而血尿酸浓度仍然无法达标的患者,尿酸酶可以作为患者药物治疗的首选药物 (Richette P, Doherty M, Pascual E, et al. Annals of the Rheumatic Diseases, 2017, 76(1):29-42.)。此外,2016 年欧洲抗风湿病联盟 (European League Against Rheumatism, EULAR) 建议,接受降尿酸治疗的患者,应监测血清尿酸值,并应持续低于 $360 \mu\text{M}$; 对于严重 (痛风石、慢性关节病、经常发作) 的痛风患者,血清尿酸水平应低于 $300 \mu\text{M}$,促使尿酸结晶更快溶解,直到尿酸结晶全部溶解,痛风消失为止;在长期治疗过程中,尿酸水平不应低于 $180 \mu\text{M}$ 。

经检索发现,目前国际上开发了三种尿酸酶类上市药物,分别为: (1) 20 世纪 70 年代在法国和意大利批准上市的黄曲霉来源尿酸酶 (Uricozyme); (2) 2000 年在美国和欧盟批准上市的尿酸酶基因 (来源于黄曲霉) 的酵母基因工程菌表达的重组尿酸酶 (Rasburicase); (3) 2010 年由美国 FDA 批准上市的聚乙二醇修饰的猪和狒狒的重组嵌合尿酸酶 (Pegloticase)。前两种尿酸酶类药物均来源于微生物,具有较强的免疫原性。Pegloticase 由猪和狒狒这两种哺乳动物尿酸酶基因嵌合重组表达,经聚乙二醇化学修饰后, Pegloticase 静脉给药的半衰期显著增加,然而,41% 的病人产生了针对 Pegloticase 的高滴度抗体,这其中 40% 的病人产生了抗 PEG 的高滴度抗体 (Lipsky P E, Calabrese L H, Kavanaugh A, et al. Arthritis Research & Therapy, 2014,

16(2):(R60)1-8.); 临床研究发现, 静脉滴注后 45%的病人产生输液反应, 包括胸闷(15%), 潮红(12%), 呼吸困难(11%)等(Baraf H S, Yood R A, Ottery F D, et al. Journal of Clinical Rheumatology Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases, 2014, 20(8):427-432.)。上述尿酸酶类药物均为冻干粉针剂, 经静脉滴注应用于人体, 虽降解尿酸的作用发挥迅速, 但可引起 77%患者的痛风急性发作(Lyseng-Williamson K A. Drugs, 2011, 71(16):2179-2192.)。在药物开发过程中, 哺乳动物尿酸酶的低免疫原性和微生物尿酸酶的高比活性, 使这两大来源的重组尿酸酶的开发及应用成为热点。

另有一种纳米颗粒组合治疗方法降解尿酸盐结晶, 采用复乳化溶剂蒸发法蒸发 PLGA 乳化溶剂制备包含尿酸酶与双氯芬酸的纳米颗粒; 由于纳米颗粒粒径小, 比表面积大, 和其它药物递送系统相比, 提高了药物通过皮肤的渗透率, 进一步制备的纳米颗粒凝胶经皮递送药物至关节滑液发挥治疗作用。该剂型制备工艺复杂, 稳定性较差, 在冷藏条件下纳米颗粒凝胶剂半衰期仅为 45.22 天, 由于大分子药物难以透过皮肤屏障, 难以发挥药效(Tiwari S, Dwivedi H, Kymonil K M, et al. Drug Deliv Transl Res, 2015, 5(3):219-230.)。

发明人所在课题组致力于尿酸酶及其药物制剂的研究, 并已申请若干项中国发明专利, 如专利号 CN201410048071.9、授权公告号 CN103834623B 的中国发明专利, 申请号 CN201510066745.2、申请公布号 CN104630168A 的中国发明专利申请, 申请号 CN201610316709.1、申请公布号 CN105838686A 的中国发明专利申请。目前, 发明人所在课题组在尿酸酶制剂方面有了进一步的研究成果。

发明内容

本发明的主要目的是: 克服现有技术存在的问题, 提供一种尿酸酶外用凝胶制剂, 使用方式为涂抹于皮肤表面, 该制剂易于制备, 稳定性好, 使用方便, 药效发挥平稳, 用药过程中易于自主控制尿酸水平, 制剂疗效的发挥不依赖于尿酸酶透过皮肤屏障进入机体。此外, 本发明还提供该制剂的制备方法, 以及该制剂的用途。

本发明解决其技术问题的技术方案如下:

一种尿酸酶外用凝胶制剂, 其特征是: 所述制剂由以下组分按重量百分比组成:

主药: 尿酸酶	大于 0 且小于或等于 1.0%,
水性凝胶基质	0.05-20%,
蛋白保护剂	0.15-20%,
保湿剂	2-25%,
螯合剂	0.01-0.20%,
透皮促进剂	0.001-3.0%,
防腐剂	0.005-0.5%,
余量为注射用水;	

所述制剂的 pH 经 pH 调节剂调整为 5-10。

优选地，所述尿酸酶包括天然尿酸酶、重组尿酸酶、嵌合尿酸酶、以及融合尿酸酶；所述天然尿酸酶来源于原核生物或真核生物；所述重组尿酸酶、嵌合尿酸酶、融合尿酸酶分别经生物工程技术制备而得；所述天然尿酸酶包括来源于微生物的尿酸酶、以及来源于哺乳动物的尿酸酶，所述微生物包括产朊假丝酵母、黄曲霉，所述哺乳动物包括猪、犬；所述重组尿酸酶包括采用生物工程技术制备的天然尿酸酶基因表达的重组尿酸酶；所述嵌合尿酸酶包括由不同天然尿酸酶基因之间的核苷酸序列嵌合、重组表达的尿酸酶嵌合蛋白；所述融合尿酸酶包括由天然尿酸酶基因与人血清白蛋白基因融合、重组表达的人血清白蛋白-尿酸酶融合蛋白，由天然尿酸酶基因与人源化抗体 Fc 片段核苷酸序列融合、重组表达的 Fc-尿酸酶融合蛋白。

更优选地，所述尿酸酶具有化学修饰，所述化学修饰包括 PEG 修饰。

优选地，所述水性凝胶基质选自天然高分子或半合成高分子或合成高分子；所述天然高分子包括淀粉、海藻酸盐、阿拉伯胶、西黄蓍胶、琼脂和明胶；所述半合成高分子包括改性纤维素和改性淀粉，所述改性纤维素包括羧甲基纤维素、甲基纤维素；所述合成高分子包括卡波姆、聚丙烯酸钠。

更优选地，所述水性凝胶基质为卡波姆 934、卡波姆 940、卡波姆 941、卡波姆 942、卡波姆 971、卡波姆 974、卡波姆 980、卡波姆 981 之一或其组合。

优选地，所述蛋白保护剂选自牛血清白蛋白（BSA）、甘露醇、蔗糖、柠檬酸钠、山梨醇之一或其组合；

所述保湿剂选自甘油、丙二醇、乙醇、透明质酸之一或其组合；

所述螯合剂选自乙二胺四乙酸的盐类之一或其组合，所述乙二胺四乙酸的盐类包括乙二胺四乙酸二钠盐（EDTA-2Na）、乙二胺四乙酸二钾盐（EDTA-2K）；

所述透皮促进剂选自氮酮、丙二醇、透明质酸、胆酸盐、脱氧胆酸盐、尿素、环状糊精、吐温-80 之一或其组合；

所述防腐剂选自苯甲酸、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、苯酚、山梨酸之一或其组合；

所述 pH 调节剂选自三乙醇胺、NaOH、NaHCO₃ 之一。

优选地，所述尿酸酶的含量为 0.001-0.1%；所述制剂的 pH 为 6-9。

本发明还提供：前文所述尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法，其特征是，包括以下步骤：

第一步、取适量的注射用水，加入透皮促进剂、保湿剂、以及螯合剂并溶解搅拌均匀；然后加入水性凝胶基质，经溶胀和/或溶解后搅拌均匀，湿热灭菌得备用物；

第二步、将蛋白保护剂、防腐剂、主药尿酸酶分别加入适量注射用水溶解，并经微孔滤膜过滤除菌备用；

第三步、将第二步所得防腐剂加入第一步所得备用物中，并以 pH 调节剂调节 pH 值至 5-10，然后加入第二步所得蛋白保护剂、主药尿酸酶以及余量注

射用水，搅拌均匀后分装，即得尿酸酶外用凝胶制剂成品。

优选地，第一步中，溶胀所用时间为过夜，湿热灭菌的条件为 115℃ 30min；第二步中，所述微孔薄膜的孔径为 0.22 μm；第三步中，调节后 pH 为 6-9；在分装时，分装至药学上可接受的容器中，所述容器包括药用铝管、塑胶管、铝塑管、聚乙烯复合软管，或者，在分装时，涂布于卫生材料制成凝胶贴剂；分装后，将所得分装物保存于 4℃ 冰箱内。

本发明还提供：前文所述尿酸酶外用凝胶制剂用于制备药物或药物组合物的用途，所述药物或药物组合物的作用为降尿酸、或治疗高尿酸血症、或治疗痛风、或治疗高尿酸血症引起的疾病。

与现有技术相比，本发明的有益效果如下：

本发明凝胶制剂的给药途径为外用涂抹于皮肤表面，降解通过汗腺分泌皮肤表面的尿酸，生成尿囊素，进而形成皮肤内外尿酸的浓度梯度，促进汗腺以微流形式持续分泌尿酸等代谢产物，发挥显著的降体内尿酸作用；该制剂疗效的发挥不依赖于尿酸酶透过皮肤屏障进入机体，不同于冻干粉针剂需静脉给药进入机体，避免了尿酸酶的过敏反应、输液反应和抗体产生；该制剂具有降解尿酸作用，除可以用于治疗高尿酸血症、痛风外，还可以用于治疗由于血液中尿酸浓度增高引起的并发症，如糖尿病、高血压、间质性肾炎、肾衰竭及其它心血管系统疾病等辅助治疗。

本发明制备方法既能够保持尿酸酶活性又能够使尿酸酶凝胶制剂长期保持稳定。本发明制备工艺简单，制剂稳定性好，使用方便，药效发挥平稳，用药过程中易于自主控制尿酸水平。

附图说明

图 1 为本发明实施例 9 的尿酸标准曲线图。

图 2 为本发明实施例 11 的高效液相色谱法测定的尿酸标准曲线图。

图 3 为本发明实施例 11 的高效液相色谱检测尿酸溶液的示例图。

图 4 为本发明实施例 11 的各实验组皮肤表面尿酸含量测定结果图。

图 5 为本发明实施例 11 的各实验组皮肤组织尿酸含量测定结果图。

图 6 为本发明实施例 12 的高效液相色谱法测定的尿囊素标准曲线图。

图 7 为本发明实施例 12 的各实验组皮肤表面尿囊素含量测定结果图

图 8 为本发明实施例 13 的结果示意图。

具体实施方式

下面参照附图并结合实施例对本发明作进一步详细描述。但是本发明不限于所给出的例子。下述实施例中的试验方法，如无特殊说明，均为常规方法；试剂和材料，如无特殊说明，均可通过商业途径获得。

实施例 1、尿酸酶外用凝胶制剂制备方案一

本实施例的尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分组成（按 100g 凝胶计）：

重组人-猪嵌合尿酸酶（主药）	5mg（0.005%）
羧甲基纤维素（水性凝胶基质）	0.20g（0.2%）
BSA（蛋白保护剂）	0.2g（0.2%）

甘油（保湿剂）	5g（5%）
EDTA-2K（螯合剂）	50mg（0.05%）
透明质酸（透皮促进剂）	12mg（0.012%）
苯甲酸钠（防腐剂）	0.3g（0.3%）

余量为注射用水；

采用 15%三乙醇胺溶液（pH 调节剂）调制剂的 pH 至 7.4。

本实施例尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法包括：

（1）主药重组人猪尿酸酶的制备：按照中国专利 104630168A 构建重组 E. coli 工程菌，将工程菌接种于 LB 固体培养基上 37℃ 培养进行活化，12h 后挑取单菌落于 LB 液体培养基中，37℃ 继续培养 12h，再按体积比为 1% 的接种量加入发酵培养基，200rpm，37℃ 培养 4h 后，加入 IPTG 诱导尿酸酶蛋白表达，继续培养 6h 后离心收集湿菌体，加入 Tris-HCl 缓冲液重悬沉淀，超声破壁，破壁条件为：功率为 60%，超 3s 隔 3s，30min。破壁菌液离心后收集沉淀，按 m:V=1g:10ml 比例加入 Tris-HCl 缓冲液重悬沉淀，离心后收集上清，采用硫酸铵分级沉淀对目的蛋白进行盐析，盐析后沉淀用蒸馏水洗 3 遍，按 m:V=1g:10ml 加入 tris-HCl 缓冲液复溶，得主药人猪嵌合尿酸酶粗酶液。

（2）取占注射用水总量 60% 重量的注射用水，加入透明质酸、甘油、EDTA-2K 并溶解搅拌均匀；然后加入羧甲基纤维素，经溶解后搅拌均匀，115℃ 湿热灭菌 30min 得备用物；

（3）将苯甲酸钠、BSA、主药重组人-猪嵌合尿酸酶分别加入适量注射用水溶解，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用；

（4）将（3）所得苯甲酸钠加入（2）所得备用物中，并以 15%三乙醇胺溶液调节 pH 值至 7.4，然后加入（3）所得 BSA、主药重组人-猪嵌合尿酸酶以及余量注射用水，搅拌均匀，分装到无菌铝管中，即得尿酸酶外用凝胶制剂成品，保存于 4℃ 冰箱中备用。

实施例 2、尿酸酶外用凝胶制剂制备方案二

本实施例的尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分组成（按 100g 凝胶计）：

产朊假丝酵母尿酸酶（主药）	20mg（0.02%）（购自 sigma 公司）
海藻酸钠（水性凝胶基质）	0.5g（0.5%）
BSA（蛋白保护剂）	0.15g（0.15%）
甘油（保湿剂）	10g（10%）
EDTA-2Na（螯合剂）	40mg（0.04%）
透明质酸（透皮促进剂）	15mg（0.015%）
山梨酸（防腐剂）	50mg（0.05%）

余量为注射用水；

采用 15%的 NaOH 溶液（pH 调节剂）调制剂 pH 至 7.5。

本实施例尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法包括：

（1）取占注射用水总量 60% 重量的注射用水，加入透明质酸、甘油、EDTA-2Na 并溶解搅拌均匀；然后加入海藻酸钠，经过夜溶胀溶解后，115℃ 湿热灭菌 30min 得备用物；

(2) 将山梨酸、BSA、主药产朊假丝酵母尿酸酶分别加入适量注射用水溶解, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌备用;

(3) 将(2)所得山梨酸加入(1)所得备用物中, 并15%的NaOH溶液调节pH值至7.5, 然后加入(2)所得BSA、主药产朊假丝酵母尿酸酶以及余量注射用水, 搅拌均匀, 分装到无菌的聚乙烯复合软管中, 即得尿酸酶外用凝胶制剂成品, 保存于4℃冰箱中备用。

实施例3、尿酸酶外用凝胶制剂制备方案三

本实施例的尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分组成(按100g凝胶计):

黄曲霉来源尿酸酶(主药)	30mg (0.03%) (购自上海谷研生物公司)
卡波姆941(水性凝胶基质)	0.25g (0.25%)
甘露醇(蛋白保护剂)	18g (18%)
甘油(保湿剂)	10g (10%)
EDTA-2K(螯合剂)	60mg (0.06%)
丙二醇(透皮促进剂)	1.5g (1.5%)
对羟基苯甲酸甲酯(防腐剂)	10mg (0.01%)

余量为注射用水;

采用15%的NaOH溶液(pH调节剂)调制剂pH至8.5。

本实施例尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法包括:

(1) 取占注射用水总量60%重量的注射用水, 加入甘油、丙二醇、EDTA-2K并溶解搅拌均匀; 然后加入卡波姆941, 经过夜溶胀溶解后, 115℃湿热灭菌30min得备用物;

(2) 将对羟基苯甲酸甲酯、甘露醇、主药黄曲霉来源尿酸酶分别加入适量注射用水溶解, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌备用;

(3) 将(2)所得对羟基苯甲酸甲酯加入(1)所得备用物中, 并以15%的NaOH溶液调节pH值至8.5, 然后加入(2)所得甘露醇、主药黄曲霉来源尿酸酶以及余量注射用水, 搅拌均匀, 分装到药用铝塑管中, 即得尿酸酶外用凝胶制剂成品, 保存于4℃冰箱中备用。

实施例4、尿酸酶外用凝胶制剂制备方案四

本实施例的尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分组成(按100g凝胶计):

聚乙二醇修饰尿酸酶(主药)	45mg (0.045%)
甲基纤维素(水性凝胶基质)	0.3g (0.3%)
甘露醇(蛋白保护剂)	18g (18%)
甘油(保湿剂)	15g (15%)
EDTA-2Na(螯合剂)	50mg (0.05%)
丙二醇(透皮促进剂)	2.5g (2.5%)
苯甲酸(防腐剂)	10mg (0.01%)

余量为注射用水;

采用10%NaHCO₃溶液(pH调节剂)调制剂pH至8.0。

本实施例尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法包括:

(1) 聚乙二醇修饰尿酸酶的制备方法: 按文献(张纯. 尿酸酶的聚乙二醇

修饰及其成药性的初步评价[D]. 重庆医科大学, 2011.) 方法对产朊假丝酵母尿酸酶进行聚乙二醇修饰, 修饰后分离纯化, 去除反应多余的聚乙二醇, 制备足够多的聚乙二醇修饰尿酸酶蛋白样品。

(2) 取占注射用水总量 60% 重量的注射用水, 加入甘油、丙二醇、EDTA-2Na 并溶解搅拌均匀; 然后加入甲基纤维素, 经溶解后搅拌均匀, 115℃ 湿热灭菌 30min 得备用物;

(3) 将苯甲酸、甘露醇、主药聚乙二醇修饰尿酸酶分别加入适量注射用水溶解, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用;

(4) 将 (3) 所得苯甲酸加入 (2) 所得备用物中, 并以 10%NaHCO₃ 溶液调节 pH 值至 8.0, 然后加入 (3) 所得甘露醇、主药聚乙二醇修饰尿酸酶, 搅拌均匀, 分装到塑胶管中, 即得尿酸酶外用凝胶制剂成品, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

实施例 5、尿酸酶外用凝胶制剂制备方案五

本实施例的尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分组成 (按 100g 凝胶计):

Fc-尿酸酶融合蛋白 (主药)	50mg (0.05%)
卡波姆 942 (水性凝胶基质)	0.3g (0.3%)
甘露醇 (蛋白保护剂)	9g (9%)
无水乙醇 (保湿剂)	15g (15%)
EDTA-2Na (螯合剂)	40mg (0.04%)
丙二醇 (透皮促进剂)	2.5g (2.5%)
苯甲酸 (防腐剂)	5mg (0.005%)

余量为注射用水;

采用 10%NaHCO₃ 溶液 (pH 调节剂) 调制剂 pH 至 8.0。

本实施例尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法包括:

(1) 取占注射用水总量 60% 重量的注射用水, 加入丙二醇、无水乙醇、EDTA-2Na 并溶解搅拌均匀; 然后加入卡波姆 942, 经过夜溶胀溶解后, 115℃ 湿热灭菌 30min 得备用物;

(2) 将苯甲酸、甘露醇、主药 Fc-尿酸酶融合蛋白分别加入适量注射用水溶解, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用;

(3) 将 (2) 所得苯甲酸加入 (1) 所得备用物中, 并以 10%NaHCO₃ 溶液调节 pH 值至 8.0, 然后加入 (2) 所得甘露醇、主药 Fc-尿酸酶融合蛋白以及余量注射用水, 搅拌均匀, 分装到塑胶管中, 即得尿酸酶外用凝胶制剂成品, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

实施例 6、尿酸酶外用凝胶制剂制备方案六

本实施例的尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分组成 (按 100g 凝胶计):

重组人-猪嵌合尿酸酶 (主药)	1g (1.0%)
阿拉伯胶 (水性凝胶基质)	20g (20%)
蔗糖 (蛋白保护剂)	15g (15%)
甘露醇 (蛋白保护剂)	5g (5%)
甘油 (保湿剂)	25g (25%)

EDTA-2K（螯合剂）	0.2g（0.2%）
氮酮（透皮促进剂）	3g（3%）
苯甲酸钠（防腐剂）	0.5g（0.5%）

余量为注射用水；

采用 15%三乙醇胺溶液（pH 调节剂）调制剂的 pH 至 7.4。

本实施例尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法包括：

（1）取占注射用水总量 60%重量的注射用水，加入氮酮、甘油、EDTA-2K 并溶解搅拌均匀；然后加入阿拉伯胶，过夜溶胀，115℃湿热灭菌 30min 得备用物；

（2）将苯甲酸钠、蔗糖、甘露醇、主药重组人-猪嵌合尿酸酶分别加入适量注射用水溶解，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用；

（3）将（2）所得苯甲酸钠加入（1）所得备用物中，并以 15%三乙醇胺溶液调节 pH 值至 7.4，然后加入（2）所得蔗糖、甘露醇、主药重组人-猪嵌合尿酸酶以及余量注射用水，搅拌均匀，分装到无菌铝管中，即得尿酸酶外用凝胶制剂成品，保存于 4℃冰箱中备用。

实施例 7、尿酸酶外用凝胶制剂制备方案七

本实施例的尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分组成（按 100g 凝胶计）：

产朊假丝酵母尿酸酶（主药）	0.5g（0.5%）
甲基纤维素（水性凝胶基质）	6g（6%）
甘露醇（蛋白保护剂）	10g（10%）
甘油（保湿剂）	15g（15%）
EDTA-2Na（螯合剂）	0.1g（0.1%）
丙二醇（透皮促进剂）	1.5（1.5%）
苯甲酸钠（防腐剂）	0.25g（0.25%）

余量为注射用水；

采用 15%的 NaOH 溶液（pH 调节剂）调制剂 pH 至 7.5。

本实施例尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法包括：

（1）取占注射用水总量 60%重量的注射用水，加入丙二醇、甘油、苯甲酸钠并溶解搅拌均匀；然后加入甲基纤维素，经过夜溶胀溶解后，115℃湿热灭菌 30min 得备用物；

（2）将 EDTA-2Na、甘露醇、主药产朊假丝酵母尿酸酶分别加入适量注射用水溶解，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用；

（3）将（2）所得苯甲酸钠加入（1）所得备用物中，并 15%的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.5，然后加入（2）所得甘露醇、主药产朊假丝酵母尿酸酶以及余量注射用水，搅拌均匀，分装到无菌的聚乙烯复合软管中，即得尿酸酶外用凝胶制剂成品，保存于 4℃冰箱中备用。

实施例 8、尿酸酶外用凝胶制剂制备方案三

本实施例的尿酸酶外用凝胶制剂由以下组分组成（按 100g 凝胶计）：

黄曲霉来源尿酸酶（主药）	0.35g（0.35%）
卡波姆 934（水性凝胶基质）	0.05g（0.05%）

BSA（蛋白保护剂）	0.15g（0.15%）
甘油（保湿剂）	2g（2%）
EDTA-2K（螯合剂）	10mg（0.01%）
透明质酸（透皮促进剂）	5mg（0.005%）
对羟基苯甲酸甲酯（防腐剂）	10mg（0.01%）

余量为注射用水；

采用 15% 的 NaOH 溶液（pH 调节剂）调节制剂 pH 至 8.5。

本实施例尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法包括：

（1）取占注射用水总量 60% 重量的注射用水，加入甘油、透明质酸、EDTA-2K 并溶解搅拌均匀；然后加入卡波姆 934，经过夜溶胀溶解后，115℃ 湿热灭菌 30min 得备用物；

（2）将对羟基苯甲酸甲酯、BSA、主药黄曲霉来源尿酸酶分别加入适量注射用水溶解，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用；

（3）将（2）所得对羟基苯甲酸甲酯加入（1）所得备用物中，并以 15% 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 8.5，然后加入（2）所得 BSA、主药黄曲霉来源尿酸酶以及余量注射用水，搅拌均匀，分装到药用铝塑管中，即得尿酸酶外用凝胶制剂成品，保存于 4℃ 冰箱中备用。

实施例 9、尿酸酶外用凝胶制剂稳定性及酶活稳定性研究

A. 尿酸酶外用凝胶制剂稳定性研究

按实施例 1 中尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法，共制备三批样品，生产批号分别为 20170912、20170913、20170914，通过下列方法进行凝胶制剂稳定性研究。

将上述凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂置于密闭无菌铝管中，分别于 37℃、室温及 4℃ 条件下保存，定时检查凝胶制剂的外观、失水、酸碱度及霉败等现象，并取样测定凝胶制剂中尿酸酶的酶活保有率，检测凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂中尿酸酶的酶活稳定性。

结果表明，三批凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂 37℃ 保存 3 个月以及室温和 4℃ 保存 6 个月后，凝胶制剂无失水、也无霉败、外观、pH 均无变化。（注：此处受篇幅限制，未将具体实验数据列于此处）

B. 尿酸酶活性测定的标准曲线测定

尿酸标准曲线的测定：用 0.1M 硼砂-硼酸溶液（pH8.5）将配制好的 600 μM 尿酸母液分别稀释为 60 μM、54 μM、48 μM、42 μM、36 μM、30 μM、24 μM、18 μM、12 μM、0 μM，测定各溶液的 OD₂₉₃，结果如表 1 所示；根据测定的数据绘制标准曲线，结果见图 1。

表 1 尿酸梯度浓度溶液配制

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
600μM 尿酸母液/ml	0	0.08	0.12	0.16	0.2	0.24	0.28	0.32	0.36	0.4
0.1M 硼砂-硼酸溶液 (pH8.5) /ml	4.0	3.92	3.88	3.84	3.80	3.76	3.72	3.68	3.64	3.6

尿酸浓度/mM	0	0.012	0.018	0.024	0.030	0.036	0.042	0.048	0.054	0.060
OD ₂₉₃	0	0.150	0.223	0.296	0.373	0.438	0.514	0.583	0.667	0.718

C. 尿酸酶活性检测:

根据测定的尿酸标准曲线的线性范围, 向比色皿中加入尿酸溶液, 根据酶液的浓度向尿酸溶液中加入适量酶液以确保底物过量, 将两者快速混匀后测定 3min 内 293nm 处的吸光值, 根据尿酸标准曲线计算尿酸的消耗量, 计算酶活。公式如下, 其中 U = 尿酸酶活力单位; $(A_0 - A)/3$ 表示在反应的 3min 内尿酸溶液在 293nm 处吸光值下降的斜率; V_t = 反应液总体积 (mL); 12.078 为尿酸在 293nm 处的微摩尔消光系数; V_e = 酶液体积 (mL)。

$$U = \frac{(A_0 - A)/3 \times V_t}{12.078 \times V_e} \quad U = \frac{(A_0 - A)/5 \times V_t}{12.078 \times V_e}$$

D. 人-猪嵌合凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂的酶活稳定性研究

将重组人-猪嵌合凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂放置在 4℃、37℃ 条件下, 于不同时间点取样, 检测重组人-猪嵌合尿酸酶活性, 结果见下表:

表 2: 37℃ 凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂酶活稳定性

时间/h	0	2	4	8	12	24	48	72
酶活保有率%	100	97	97	97	93	92	85	81

由表 2 可知, 凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂在 37℃ 条件下 24 小时酶活保有率保持在 90% 以上, 48 小时 85%, 72 小时, 酶活保有率仍可达到 81%。

表 3: 4℃ 凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂酶活稳定性

时间/周	0	1	3	7	11	20	24
酶活保有率%	100	99	93	91	93	86	86

由表 3 可知, 凝胶制剂尿酸酶外用凝胶制剂在 4℃ 条件下 6 个月酶活保有率保持在 85% 以上。

综上可知, 本发明的尿酸酶外用凝胶制剂, 可以保护尿酸酶免于外界多种因素的影响, 有利于稳定尿酸酶, 保护尿酸酶活性。

实施例 10、尿酸酶外用凝胶制剂局部刺激性实验

取健康家兔 6 只, 体重 1.8-2.2kg, 于背部脊柱两侧对称剃毛, 每侧约 4×4cm², 休息 24h, 正常饲养。一侧涂适量实施例 1 尿酸酶外用凝胶制剂, 另一侧涂适量实施例 1 采用的水性凝胶基质, 24h 洗掉残留物, 连续观察 20 天, 家兔皮肤并未出现红斑、丘疹、水泡等现象。

实施例 11、皮肤尿酸含量测定

A. 尿酸标准曲线绘制

(1) 检测尿酸方法

色谱条件: Waters C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 流动相: 磷酸 3mL, 甲醇 30mL, 加超纯水定容; 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 293nm; 柱温: 30℃, 进样量 20 μL。

(2) 尿酸母液 (5000μM) 配制:

称取 84mg 尿酸于 100mL 烧杯中, 加入适量硼砂-硼酸缓冲溶液, 磁力搅

拌器搅拌至其完全溶解，定容至 100ml 即得。

(3) 0-500 μM 尿酸标曲绘制：

取 5mM 尿酸，依次用硼砂-硼酸缓冲溶液稀释至 500, 250, 100, 50, 20, 10 μM ，吸取 20 μL 上述溶液，按体积比 1:10 比例加入蛋白沉淀剂，冰水浴 5min，离心后吸取上清进样后以尿酸浓度和峰面积绘制标准曲线，如图 2 所示；检测尿酸溶液的色谱图示例如图 3 所示。

B. 高效液相色谱测定皮肤表面的尿酸含量

取 5-6 周龄雄性昆明小鼠 24 只，按体重随机法分成以下 4 组：(1) 空白组，(2) 模型组，(3) 阴性对照组，(4) 尿酸酶凝胶给药组。每组 6 只小鼠，空白组小鼠正常饮食，不给予尿酸酶外用凝胶制剂或水性凝胶基质；模型组小鼠采用每日腹腔注射尿酸钠混悬液，同时拌食法给予含酵母粉饲料，制备小鼠高尿酸血症模型；阴性对照组造模方法同模型组，造模成功后，给予实施例 1 采用的水性凝胶基质（即空白凝胶）；尿酸酶凝胶给药组：造模方法同模型组，造模成功后，给予实施例 1 的尿酸酶外用凝胶制剂。

第一次给药前，先将各组小鼠背部裸露皮肤消毒并用棉球清洗，擦拭干净后将小鼠放回笼中，凝胶给药组给予尿酸酶外用凝胶，阴性对照组给予空白凝胶，待凝胶自然风干后，小鼠放回笼中，自由饮食饮水，分别在不同时段，用棉签沾取适量生理盐水擦拭各组小鼠背部皮肤，再将棉签上的水分挤入 EP 管中，标记为“皮肤擦拭样品”。所得样品离心后加入一定比例蛋白沉淀剂，离心后取上清用于 HPLC 测定，积分法得到尿酸峰面积，再根据标准曲线算出尿酸浓度。

由图 4 可以看出，空白组和模型组小鼠皮肤表面尿酸在 8h 后尿酸浓度逐渐达上限，且模型组小鼠皮肤表面尿酸含量是空白组的 2.4 倍，阴性对照组与模型组相同，给药组由于凝胶中的尿酸酶可不断降解由汗腺向皮肤表面分泌的尿酸，因此 4-8h 皮肤表面尿酸含量均比空白组低，但 12h 后超过空白组，24h 后，皮肤表面尿酸浓度超过模型组，因为皮肤表面尿酸与血清尿酸浓度之间呈正比关系，由于皮肤表面尿酸浓度的降低，致使皮肤内外尿酸形成了浓度梯度，使体内尿酸通过汗腺自发不断地排到皮肤表面，以到达与血液尿酸相对于的皮肤尿酸浓度，也就是模型组皮肤尿酸浓度，而尿酸酶凝胶给药组的皮肤表面尿酸排泄量明显超过了模型组，因此可以说明尿酸酶凝胶不仅可以降解皮肤表面尿酸，同时也能起到促进皮肤尿酸排泄的作用。

C. 高效液相色谱测定皮肤组织的尿酸含量

给药一周后，颈椎脱臼处死小鼠，将各组小鼠皮肤组织取下并匀浆，离心后吸取上清至 EP 管中，按一定比例加入蛋白沉淀剂，离心后吸取上清用于 HPLC 测定，积分法得到尿酸峰面积，再根据标准曲线算出尿酸浓度，再按下述公式得到单位重量的皮肤尿酸含量：

$$\text{单位皮肤尿酸含量} = \text{皮肤尿酸含量} (\mu\text{M}) / \text{皮肤重量} (\text{g})$$

由图 5 可以看出，高尿酸血症的小鼠（模型组）的皮肤组织尿酸水平为正常小鼠（空白组）的皮肤组织尿酸水平的 2 倍；阴性对照组由于给予空白凝胶，不具有分解尿酸的作用，因而不能阻止小鼠皮肤尿酸水平的升高，其

皮肤组织尿酸水平与模型组接近，仍然为空白组皮肤尿酸水平的 2 倍；给药组给予尿酸酶外用凝胶制剂，由于尿酸酶能够发挥降解尿酸的作用，可以将不断分泌出皮肤的尿酸降解，从而使皮肤组织尿酸水平降低，且给药一周后，给药组小鼠的皮肤组织尿酸水平与空白组小鼠皮肤组织尿酸水平相近，说明给予一周的尿酸酶外用凝胶制剂能起到非常显著的降低小鼠皮肤组织尿酸的效果，且高尿酸血症小鼠的血尿酸水平与皮肤尿酸水平呈正比关系，皮肤组织的尿酸水平降低，意味着给药组小鼠的血尿酸水平也会跟着降低，从而起到降低血尿酸水平的作用。

实施例 12、皮肤尿囊素含量的检测

A. 尿囊素标准曲线的绘制

(1) 检测尿囊素的方法

色谱条件：Dubhe C18 柱 (250mm×4.6mm, 5μm)，流动相：甲醇-水 (10:90)；柱温：30℃；检测波长：210nm；流速：1ml×min⁻¹；进样 10μl。

(2) 尿囊素母液 (500 μM) 配制：

用分析天平精密称取 0.02g 尿囊素标准品于 100ml 水中，搅拌并溶解充分，用玻璃棒引流至 250ml 洁净的容量瓶中，继续加水定容至刻度线，混合均匀后即得 500 μM 尿囊素标准溶液。

(3) 0-500 μM 尿囊素标曲绘制：

取 500 μM 尿囊素溶液，依次用蒸馏水稀释至 250, 100, 50, 20, 10 μM，吸取 20 μL 上述溶液，按一定比例加入蛋白沉淀剂，冰水浴 5min，离心后吸取上清进样后以尿囊素浓度和峰面积绘制标准曲线，如图 6 所示。

B. 高效液相色谱测定给药后皮肤表面的尿囊素含量

将收集的尿酸酶凝胶给药组的“皮肤擦拭样品”，离心取上清后加入一定比例蛋白沉淀剂，离心后上清用于 HPLC 检测，积分法得到尿囊素峰面积，再根据标准曲线算出尿囊素浓度。

结果如图 7 所示，给药 4h 后，给药组由于皮肤表面涂抹了尿酸酶凝胶，可不断降解由体内排泄到皮肤表面的尿酸，生成尿囊素，因此皮肤表面的尿酸含量低于空白组，4-12h，尿囊素生成量不断上升，说明此时凝胶依然保有酶活，具有降解皮肤尿酸的能力，直至 24h，此时尿囊素生成量相比于 12h 多出了 0.3 μM，二者相接近，推测此时凝胶中的尿酸酶已被充分反应，或是被皮肤表面的蛋白酶降解及小鼠舔舐而失活，但此时依然有尿酸不断从体内排到体外，在皮肤表面不断的积累，最终给药组 24h 的尿酸排泄量超过模型组 24h 的皮肤表面尿酸含量。因此可以说明，尿酸酶凝胶制剂可以将皮肤表面尿酸转化为水溶性更高的尿囊素，且给药 12h 后，皮肤表面的尿酸酶凝胶制剂依然还残有活性，使得血尿酸源源不断的排出体内，同时还增加了皮肤尿酸的排泄量，从而起到快速持续的降低血尿酸水平的作用。

实施例 13、尿酸酶外用凝胶制剂药效学研究

A：小鼠高尿酸血症造模

空白组仅给予普通饲料饲养；模型组、阴性对照组、给药组每日腹腔注射尿酸钠混悬液 1 次，同时拌食法给予含酵母粉饲料。

B: 动物分组、给药

取 5-6 周龄雄性昆明小鼠 56 只, 按体重随机法分为以下 7 组: 空白组、模型组、阴性对照组、给药组 1 (UOX₈₃ 凝胶: 实施例 1 的重组人-猪嵌合尿酸酶外用凝胶制剂, 规格 25mg/100g, 批次: 20180512)、给药组 2 (UOX_{FEU} 凝胶: 实施例 2 的产朊假丝酵母尿酸酶外用凝胶制剂, 规格 25mg/100g, 批次: 20180512)、给药组 3 (实施例 4 的聚乙二醇修饰尿酸酶外用凝胶制剂, 规格 25mg/100g, 批次: 20180513)、给药组 4 (实施例 5 的 Fc-尿酸酶融合蛋白外用凝胶制剂, 规格 25mg/100g, 批次: 20180513)。

空白组: 不造模、不用药; 模型组: 每日造模、不用药; 阴性对照组: 连续造模、背部去毛涂抹空白凝胶 (采用实施例 1 的水性凝胶基质); 给药组: 连续造模, 造模成功后, 背部去毛每日涂抹相应的尿酸酶外用凝胶制剂; 除空白组不用造模外, 其他小鼠给药期间正常造模。

C. 血尿酸水平测定

连续给药一周后, 对各组小鼠进行眼眶取血。4℃ 静置一段时间, 离心取上清, HPLC 进样 20 μL, 记录尿酸峰面积, 根据尿酸标准曲线计算血液尿酸含量。

表 4: 连续给药一周后各组小鼠血清尿酸水平 ($\bar{x} \pm s$, n=8, μM)

项目	空白组	模型组	阴性对照组
给药前	63.243±9.232	125.457±23.132	112.317±8.518
给药后	65.527±14.647	128.323±26.222	114.067±2.829

项目	给药组 1	给药组 2	给药组 3	给药组 4
给药前	121.937±6.672	106.433±8.377	116.220±2.224	112.433±2.829
给药后	56.673±11.632***	76.530±18.919*	67.643±4.942**	72.393±15.071**

注: *, **和***分别表示在 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ 的水平上与模型组之间差异的显著性。

由上表及图 8 可知, 经过高尿酸血症造模的模型组、阴性对照组、给药组 1、给药组 2、给药组 3 及给药组 4 的小鼠的血清尿酸水平为空白组小鼠血清尿酸水平的两倍以上, 给药组 1、给药组 2、给药组 3 及给药组 4 在给药一周后均可以将小鼠血尿酸水平降至与空白组相近。

综上, 本发明的尿酸酶外用凝胶制剂不仅具有显著降解皮肤表面的尿酸, 以转化成尿囊素, 还可促进血液尿酸不断向皮肤表面排泄, 进而降低血清尿酸水平。

除上述实施例外, 本发明还可以有其他实施方式。凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案, 均落在本发明要求的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种尿酸酶外用凝胶制剂，其特征是：所述制剂由以下组分按重量百分比组成：

主药：尿酸酶	大于 0 且小于或等于 1.0%，
水性凝胶基质	0.05-20%，
蛋白保护剂	0.15-20%，
保湿剂	2-25%，
螯合剂	0.01-0.20%，
透皮促进剂	0.001-3.0%，
防腐剂	0.005-0.5%，
余量为注射用水；	

所述制剂的 pH 经 pH 调节剂调整为 5-10。

2. 根据权利要求 1 所述的尿酸酶外用凝胶制剂，其特征是，所述尿酸酶包括天然尿酸酶、重组尿酸酶、嵌合尿酸酶、以及融合尿酸酶；所述天然尿酸酶来源于原核生物或真核生物；所述重组尿酸酶、嵌合尿酸酶、融合尿酸酶分别经生物工程技术制备而得；所述天然尿酸酶包括来源于微生物的尿酸酶、以及来源于哺乳动物的尿酸酶，所述微生物包括产朊假丝酵母、黄曲霉，所述哺乳动物包括猪、犬；所述重组尿酸酶包括采用生物工程技术制备的天然尿酸酶基因表达的重组尿酸酶；所述嵌合尿酸酶包括由不同天然尿酸酶基因之间的核苷酸序列嵌合、重组表达的尿酸酶嵌合蛋白；所述融合尿酸酶包括由天然尿酸酶基因与人血清白蛋白基因融合、重组表达的人血清白蛋白-尿酸酶融合蛋白，由天然尿酸酶基因与人源化抗体 Fc 片段核苷酸序列融

合、重组表达的 Fc-尿酸酶融合蛋白。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述一种尿酸酶外用凝胶制剂,其特征是,所述尿酸酶具有化学修饰,所述化学修饰包括 PEG 修饰。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述一种尿酸酶外用凝胶制剂,其特征是,所述水性凝胶基质选自天然高分子或半合成高分子或合成高分子;所述天然高分子包括淀粉、海藻酸盐、阿拉伯胶、西黄蓍胶、琼脂和明胶;所述半合成高分子包括改性纤维素和改性淀粉,所述改性纤维素包括羧甲基纤维素、甲基纤维素;所述合成高分子包括卡波姆、聚丙烯酸钠。

5. 根据权利要求 4 所述一种尿酸酶外用凝胶制剂,其特征是,所述水性凝胶基质为卡波姆 934、卡波姆 940、卡波姆 941、卡波姆 942、卡波姆 971、卡波姆 974、卡波姆 980、卡波姆 981 之一或其组合。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述一种尿酸酶外用凝胶制剂,其特征是,所述蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、甘露醇、蔗糖、柠檬酸钠、山梨醇之一或其组合;

所述保湿剂选自甘油、丙二醇、乙醇、透明质酸之一或其组合;

所述螯合剂选自乙二胺四乙酸的盐类之一或其组合,所述乙二胺四乙酸的盐类包括乙二胺四乙酸二钠盐、乙二胺四乙酸二钾盐;

所述透皮促进剂选自氮酮、丙二醇、透明质酸、胆酸盐、脱氧胆酸盐、尿素、环状糊精、吐温-80 之一或其组合;

所述防腐剂选自苯甲酸、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、苯酚、山梨酸之一或其组合;

所述 pH 调节剂选自三乙醇胺、NaOH、NaHCO₃ 之一。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述尿酸酶外用凝胶制剂，其特征是，所述尿酸酶的含量为 0.001-0.1%；所述制剂的 pH 为 6-9。

8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述尿酸酶外用凝胶制剂的制备方法，其特征是，包括以下步骤：

第一步、取适量的注射用水，加入透皮促进剂、保湿剂、以及螯合剂并溶解搅拌均匀；然后加入水性凝胶基质，经溶胀和/或溶解后搅拌均匀，湿热灭菌得备用物；

第二步、将蛋白保护剂、防腐剂、主药尿酸酶分别加入适量注射用水溶解，并经微孔滤膜过滤除菌备用；

第三步、将第二步所得防腐剂加入第一步所得备用物中，并以 pH 调节剂调节 pH 值至 5-10，然后加入第二步所得蛋白保护剂、主药尿酸酶以及余量注射用水，搅拌均匀后分装，即得尿酸酶外用凝胶制剂成品。

9. 根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征是，第一步中，溶胀所用时间为过夜，湿热灭菌的条件为 115℃ 30min；第二步中，所述微孔薄膜的孔径为 0.22 μm；第三步中，调节后 pH 为 6-9；在分装时，分装至药学上可接受的容器中，所述容器包括药用铝管、塑胶管、铝塑管、聚乙烯复合软管，或者，在分装时，涂布于卫生材料制成凝胶贴剂；分装后，将所得分装物保存于 4℃ 冰箱内。

10. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述尿酸酶外用凝胶制剂用于制备药物或药物组合物的用途，所述药物或药物组合物的作用为降尿

酸、或治疗高尿酸血症、或治疗痛风、或治疗高尿酸血症引起的疾病。

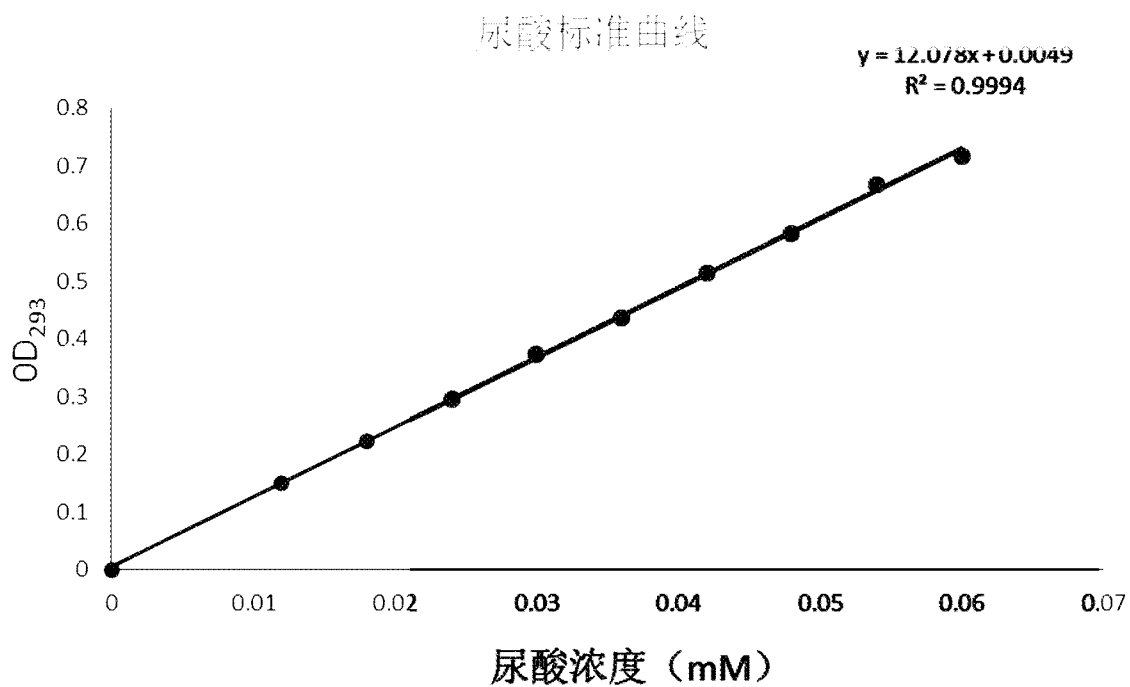


图 1

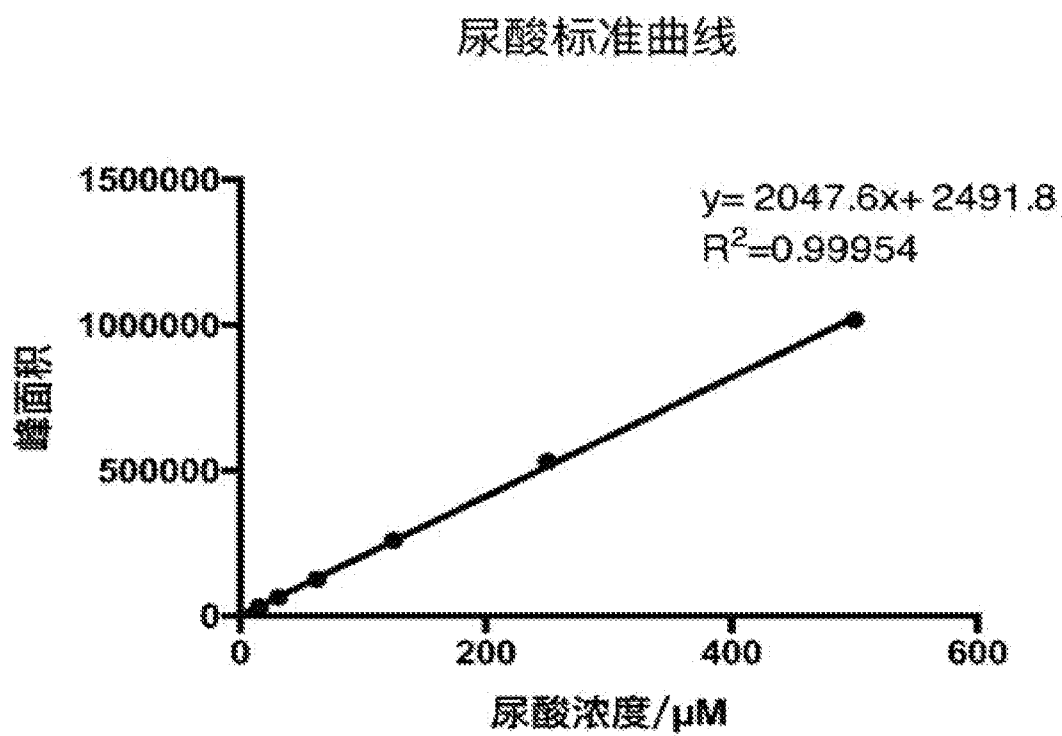


图 2

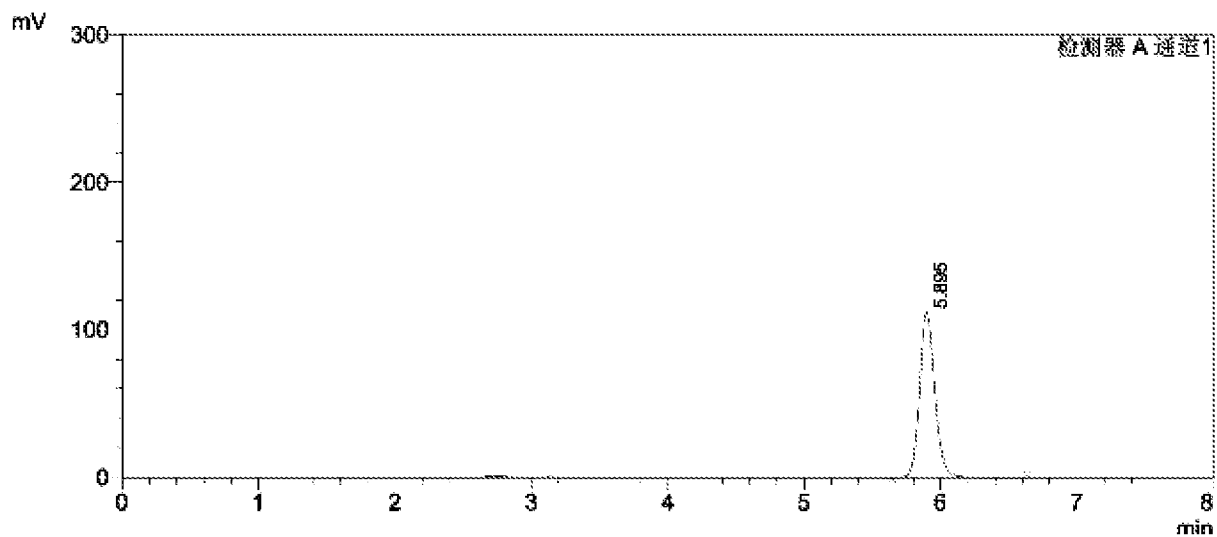


图 3

各实验组皮肤表面尿酸含量 (n=6)

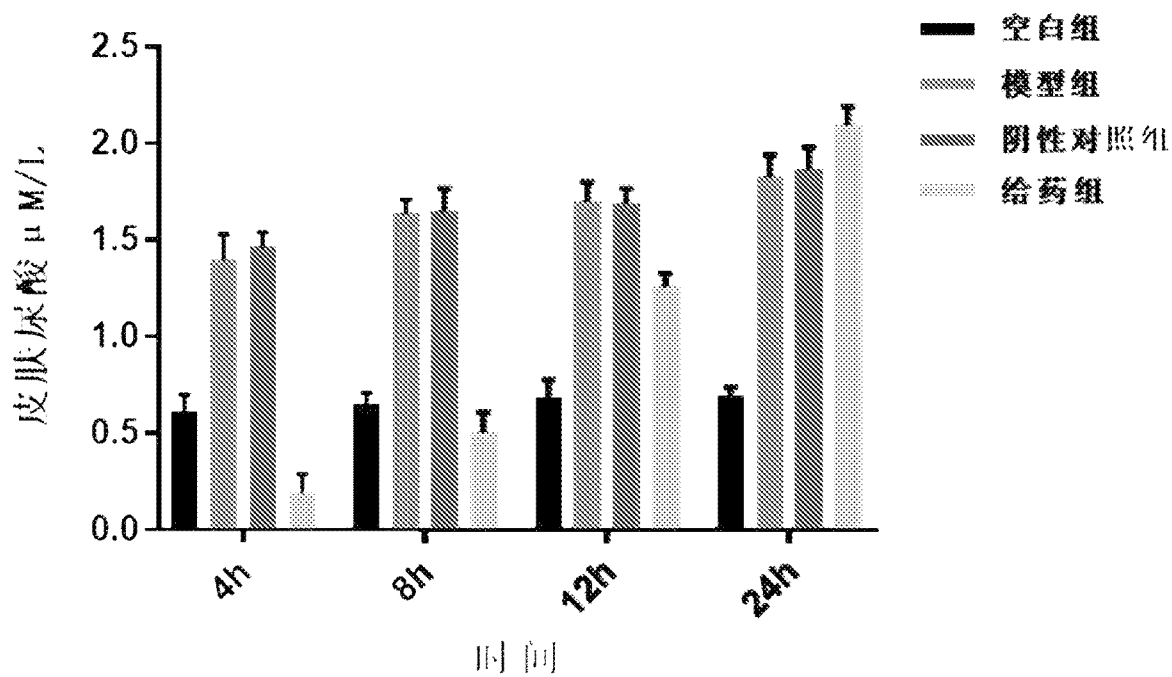


图 4

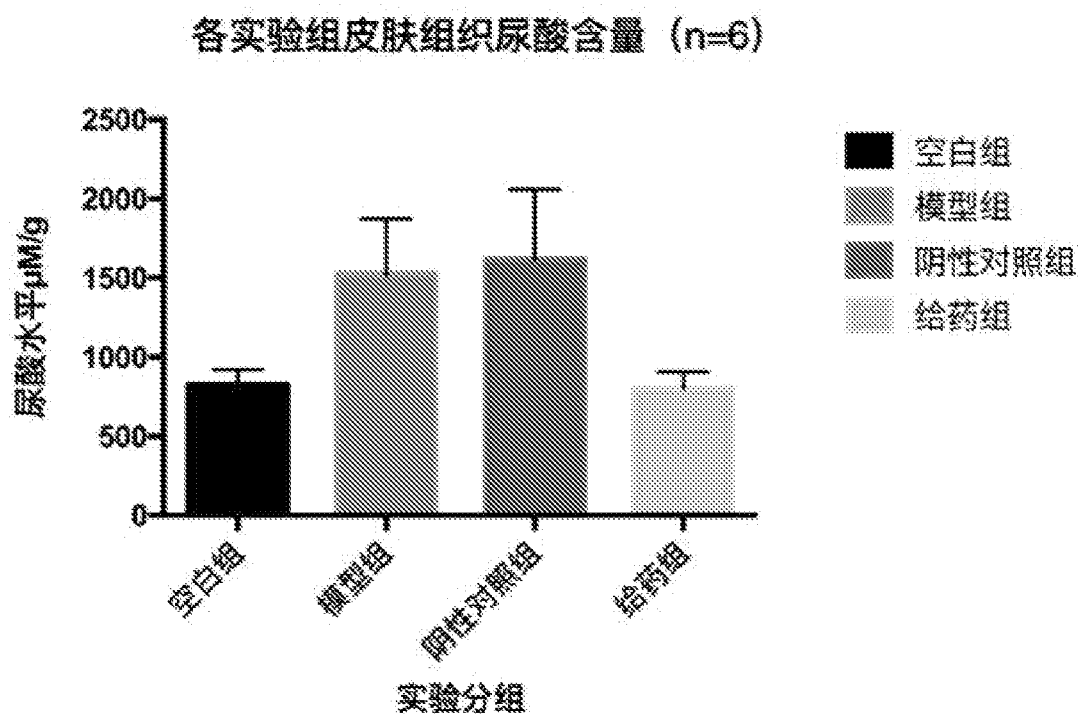


图 5

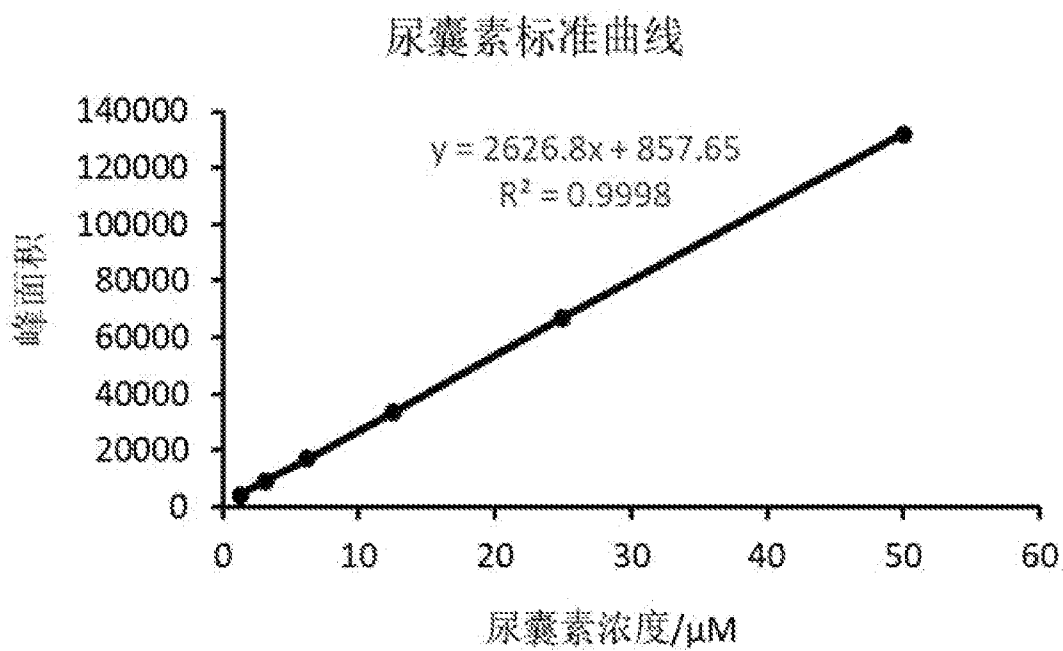


图 6

凝胶给药组皮肤表面尿囊素含量 (n=6)

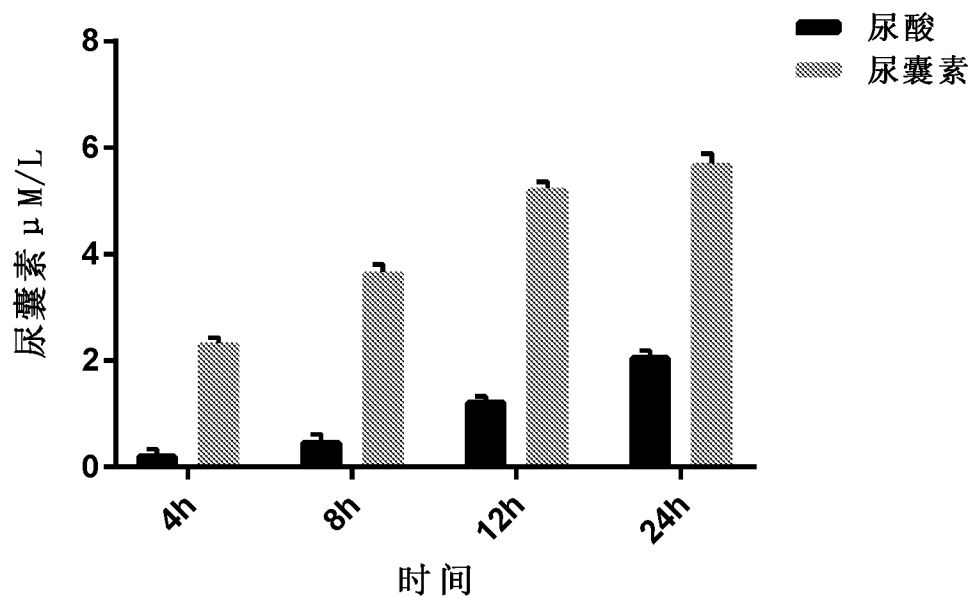


图 7

给药一周后各组别小鼠血尿酸水平 (n=8)

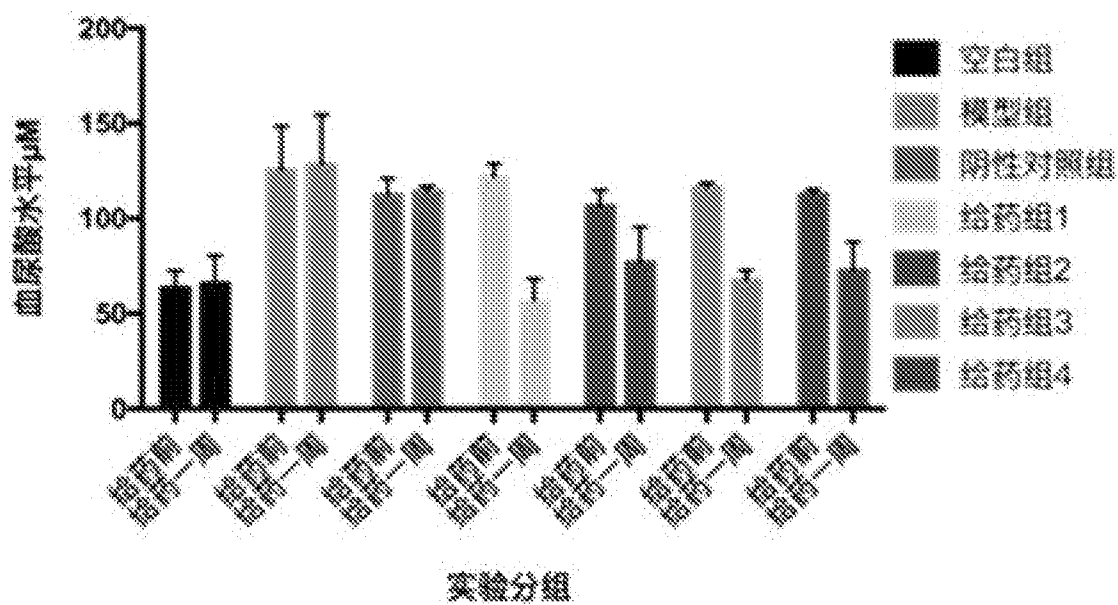


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/103968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/06(2006.01)i; A61K 47/38(2006.01)i; A61K 38/44(2006.01)i; A61P 19/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; TWTXT; CNKI; 读秀, DUXIU; DWPI; EPODOC; CA; NCBI; VEN: 尿酸酶, 尿酸氧化酶, 凝胶, 外用, 皮肤, 透皮, 软膏, 乳膏, 痛风, 尿酸, urate oxidase, uricase, gel, gelatin, ointment, cream, external, skin, transdermal, percutaneous, gouty, gout, uric acid, ua

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 106902349 A (YUNNAN UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE) 30 June 2017 (2017-06-30) claims 1-6 and 10	1-10
Y	CN 104066324 A (CYMABAY THERAPEUTICS, INC.) 24 September 2014 (2014-09-24) claims 1-12, and description, paragraphs [0077] and [0078]	1-10
PX	CN 109223707 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 18 January 2019 (2019-01-18) claims 1-10	1-10
A	CN 101302501 A (LIU, Guoan; YANG, Zhong) 12 November 2008 (2008-11-12) claims 1-13	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2019

Date of mailing of the international search report

04 December 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/103968

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106902349	A	30 June 2017	None			
CN	104066324	A	24 September 2014	MX	2014005398	A	08 April 2015
				PH	12014500990	A1	04 August 2014
				EP	2775836	A1	17 September 2014
				AU	2011380510	A1	29 May 2014
				CN	109045009	A	21 December 2018
				NZ	624726	A	29 January 2016
				EP	2775836	B8	24 October 2018
				SG	11201401981T	A	29 May 2014
				IL	232384	A	31 October 2017
				EP	2775836	A4	20 May 2015
				CL	2014001157	A1	16 January 2015
				EA	201490928	A1	28 November 2014
				WO	2013066353	A1	10 May 2013
				AU	2011380510	B2	12 May 2016
				ES	2698396	T3	04 February 2019
				KR	101848121	B1	11 April 2018
				KR	20140121384	A	15 October 2014
				IL	232384	D0	30 June 2014
				DK	2775836	T3	03 December 2018
				MX	357510	B	12 July 2018
				EP	2775836	B1	12 September 2018
				CA	2859693	A1	10 May 2013
				BR	112014010729	A2	20 March 2018
				CA	2859693	C	22 May 2018
				JP	2014532760	A	08 December 2014
				JP	6008974	B2	19 October 2016
				PL	2775836	T3	28 February 2019
CN	109223707	A	18 January 2019	None			
CN	101302501	A	12 November 2008	CN	101302501	B	04 July 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/103968

A. 主题的分类

A61K 9/06(2006.01)i; A61K 47/38(2006.01)i; A61K 38/44(2006.01)i; A61P 19/06(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS; CPRSABS; CNTXT; TWXT; CNKI; 读秀; DWPI; EPDOC; CA; NCBI; VEN: 尿酸酶, 尿酸氧化酶, 凝胶, 外用, 皮肤, 透皮, 软膏, 乳膏, 痛风, 尿酸, urate oxidase, uricase, gel, gelatin, ointment, cream, external, skin, transdermal, percutaneous, gouty, gout, uric acid, ua

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 106902349 A (云南中医学院) 2017年 6月 30日 (2017 - 06 - 30) 权利要求1-6、10	1-10
Y	CN 104066324 A (西玛贝医药公司) 2014年 9月 24日 (2014 - 09 - 24) 权利要求1-12、说明书第[0077]、[0078]段	1-10
PX	CN 109223707 A (中国药科大学) 2019年 1月 18日 (2019 - 01 - 18) 权利要求1-10	1-10
A	CN 101302501 A (刘国安、杨忠) 2008年 11月 12日 (2008 - 11 - 12) 权利要求1-13	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 11月 13日

国际检索报告邮寄日期

2019年 12月 4日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

孙镜沂

电话号码 62089169

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/103968

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106902349	A	2017年 6月 30日	无			
CN	104066324	A	2014年 9月 24日	MX	2014005398	A	2015年 4月 8日
				PH	12014500990	A1	2014年 8月 4日
				EP	2775836	A1	2014年 9月 17日
				AU	2011380510	A1	2014年 5月 29日
				CN	109045009	A	2018年 12月 21日
				NZ	624726	A	2016年 1月 29日
				EP	2775836	B8	2018年 10月 24日
				SG	11201401981T	A	2014年 5月 29日
				IL	232384	A	2017年 10月 31日
				EP	2775836	A4	2015年 5月 20日
				CL	2014001157	A1	2015年 1月 16日
				EA	201490928	A1	2014年 11月 28日
				WO	2013066353	A1	2013年 5月 10日
				AU	2011380510	B2	2016年 5月 12日
				ES	2698396	T3	2019年 2月 4日
				KR	101848121	B1	2018年 4月 11日
				KR	20140121384	A	2014年 10月 15日
				IL	232384	D0	2014年 6月 30日
				DK	2775836	T3	2018年 12月 3日
				MX	357510	B	2018年 7月 12日
				EP	2775836	B1	2018年 9月 12日
				CA	2859693	A1	2013年 5月 10日
				BR	112014010729	A2	2018年 3月 20日
				CA	2859693	C	2018年 5月 22日
				JP	2014532760	A	2014年 12月 8日
				JP	6008974	B2	2016年 10月 19日
				PL	2775836	T3	2019年 2月 28日
CN	109223707	A	2019年 1月 18日	无			
CN	101302501	A	2008年 11月 12日	CN	101302501	B	2012年 7月 4日