

提高蛋白质及多肽类药物肺部给药生物利用度的方法及其作用机制

姜毓丽, 张望刚, 陈国神(浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013)

摘要:目的 介绍国内外提高蛋白质与多肽类药物肺部给药系统生物利用度的方法及其作用机制的最新研究进展。方法 对国内外最新发表的相关文献进行分析、整理和综合。结果 吸收促进剂、酶抑制剂及脂质体均可使蛋白质及多肽类药物的肺部吸收明显提高, 甚至达到治疗所需的生物利用度。结论 蛋白质及多肽类药物的肺部给药系统具有广阔的应用前景。

关键词: 蛋白质及多肽类药物; 肺部给药; 生物利用度

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)06-0468-03

Novel technologies and mechanisms of enhancing the bioavailability of protein and peptide drugs through pulmonary delivery

JIANG Yu-li, ZHANG Wang-gang, CHEN Guo-shen(*Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To review recent advances in increasing the bioavailability of therapeutic protein and peptide drugs, and their mechanism of action and effectiveness. **METHODS** To collect and analyse the latest newly published articles. **RESULTS** Absorption enhancer, protease inhibitors and liposomes have their potential to achieve substantial bioavailability of protein and peptide drugs from pulmonary administration. **CONCLUSION** Pulmonary delivery for protein and peptide drugs has grand prospect.

KEY WORDS: protein and peptide drugs; pulmonary delivery; bioavailability

生物技术药物(biotech drugs)是采用 DNA 重组技术或其他新生物技术生产的药物^[1]。广义的生物技术药物应包括重组蛋白质药物和重组 DNA 药物两大类, 现已广泛用于治疗癌症、艾滋病、冠心病、多发性硬化症、贫血、糖尿病、心力衰竭和一些罕见的遗传疾病。目前国内外已批准上市的药物约 40 多种, 正在研究的达数百种之多。生物技术药物的研究和开发, 已经成为医药产业中的一个重要的领域。

由于蛋白质和多肽类生物药物的不稳定性, 对酶敏感而又不易穿透胃肠黏膜, 现多以注射形式给药, 使用很不方便。研究蛋白质及多肽类药物非注射途径给药系统, 不仅有益于提高病人的顺应性, 方便用药, 同时也有利于开拓这类药物的新用途和新市场。蛋白质及多肽类药物的非注射途径给药主要通过黏膜吸收, 包括口服、鼻腔、直肠、口腔、眼内, 透皮和肺部给药。其中, 肺部吸入给药作为该类药物无创给药产生局部或全身治疗作用的新途径正越来越受到人们的关注。

蛋白质及多肽类药物肺部给药与其他黏膜给药相比, 具有以下优点: ①酶的活性较低; ②吸收总表面积大(100m^2); ③有丰富的毛细血管网; ④肺泡上皮细胞层很薄, 只有 $0.1 \sim 0.2\mu\text{m}$; ⑤气-血屏障较小, 只有 $0.5\mu\text{m}$ 左右。

但是, 相对于注射途径给药, 蛋白质及多肽类药物肺部给药系统的生物利用度仍然很低。为了提高这类药物的生

物利用度, 一般采用以下方法: ①吸收促进剂; ②酶抑制剂; ③对药物进行修饰或制成脂质体。笔者拟对这类药物的肺部吸收做一综述, 介绍提高蛋白质及多肽类药物生物利用度的方法及其作用机制的最新研究进展。

1 吸收促进剂^[2]

1.1 胆酸盐类表面活性剂

主要包括胆酸钠、去氧胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和去氧甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠和去氧牛磺胆酸钠等。

国内有报道胆酸钠能增加胰岛素的肺部吸收, 浓度为 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胆酸钠使血糖下降 69.1% ^[3]。其机制可能通过改变肺黏膜厚度; 保护药物不被代谢酶降解; 改变黏膜蛋白的空间构象; 打开细胞间紧密连接, 形成胶束使膜脂质与蛋白溶解以增加细胞旁路吸收, 来促进蛋白质的肺部吸收。

含牛磺胆酸钠的胰岛素吸入剂, 其生物利用度 $[(23.2 \pm 4.4)\%, \text{对照组为}(2.6 \pm 0.3)\%]$ 显著增加。1%胆酸盐类的乙醇溶液促进胰岛素吸收作用大小顺序为: 去氧胆酸钠 > 胆酸钠 > 甘氨酸胆酸钠 > 去氧甘氨酸胆酸钠 > 去氧牛磺胆酸钠, 均高于无胆酸盐组^[4]。

1.2 脂肪酸盐和非离子型表面活性剂

实验证明, 脂肪酸盐和一些非离子型表面活性剂可增加蛋白质和多肽类药物的吸收。

据报道^[5]1%月桂醇醚的重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)溶液,生物利用度可提高到37%。表面活性剂促进大分子药物肺部转运的机制目前还不十分清楚,可能是:与细胞相互作用,改变细胞膜上的磷脂排列,增加膜的流动性及通透性以促进药物的渗透。

王智瑛等^[6]研究了不同促进剂对鲑鱼降钙素(sCT)大鼠肺部给药系统的促渗作用。采用放射免疫分析法测定sCT溶液经大鼠肺部给药后的体内血清降钙素浓度,并与肌内注射对照,计算不同条件下sCT的相对生物利用度(Fr),结果表明:与肌内注射相同剂量2μg·kg⁻¹sCT溶液相比,其肺吸收的生物利用度更高,Fr值为121.0%。渗透促进剂辛酸钠、牛磺胆酸钠、苜蓿78、壳聚糖、卵磷脂及酸性环境(pH3.0)均可显著增加sCT的肺部吸收,而加入2-HP-β-CD,无论浓度高低,对肺部肽类药物的吸收促进作用均不明显,与文献报道环糊精可提高大分子药物的生物利用度不同。

表1 渗透促进剂对鲑鱼降钙素(2μg·kg⁻¹)肺部吸收相对生物利用度的影响^[6]($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 1 Relative bioavailability of salmon calcitonin solution after intratracheal administration at the different dose in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Condition	AUC(ng·L ⁻¹ ·h)	Fr(%)
肌内注射	1086 ± 247	100.0
肺部给药		
pH 7.0	1314 ± 212	121.0
+ 牛磺胆酸钠 0.5%	1832 ± 257 **	168.7 **
+ 牛磺胆酸钠 3%	2019 ± 343 **	185.9 **
+ 辛酸钠 0.5%	1496 ± 88 *	137.8 *
+ 辛酸钠 3%	1772 ± 334 *	163.2 *
+ 苜蓿 78 0.5%	1806 ± 340 **	166.3 **
+ 苜蓿 78 3%	2138 ± 465 **	196.9 **
+ 2-羟丙基-β-环糊精 0.5%	1468 ± 530	135.2
+ 2-羟丙基-β-环糊精 3%	1480 ± 195	136.3
+ 壳聚糖 0.5%	1676 ± 218 *	154.3 *
+ 卵磷脂 3%	1727 ± 338 *	159.0 *
pH 3.0	1755 ± 175 **	161.6 **

注:与肌内注射相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs group i. m.

1.3 其他类

1.3.1 稀土元素化合物 稀土元素位于化学元素周期表第三副族,共17个元素。其中原子序数较小的钪Sc、钇Y和镧La、铈Ce、镨Pr、钕Nd、钷Pm、钐Sm、铕Eu称为“轻稀土元素”,原子序数比较大的钆Gd、铽Tb、镝Dy、钬Ho、铒Er、铥Tm、镱Yb、镥Lu称为“重稀土元素”。

近来,稀土元素化合物(Ln³⁺)被用作肺部给药系统的蛋白质吸收促进剂^[7]。它可与膜脂质和膜蛋白结合,引起膜蛋白构象改变、脂质的相转变和膜穿孔,从而促进外源蛋白的吸收。含氯化铈(CeCl₃)和氯化钆(GdCl₃)的胰岛素气管内灌注,其相对生物利用度分别为57.9%和59.5%,氯化镧(LaCl₃)对胰岛素吸收的促进作用较弱,而氯化镨(LuCl₃)则

无吸收促进作用。该研究同时指出在原子序数两端的稀土元素,吸收促进作用明显弱于原子序数在中间的。

研究发现氯化钆(GdCl₃)能显著增强肺部导入胰岛素对大鼠的降糖作用,浓度0.04mg·kg⁻¹和0.2mg·kg⁻¹血糖降低程度分别为32.2%和36.3%,而稀土化合物氯化镧则无明显的促进作用^[3]。

1.3.2 羟甲基丙氨酸 低分子氨基酸羟甲基丙氨酸(H-MAP)可提高胰岛素在大鼠肺内吸收的生物利用度。实验表明含H-MAP的胰岛素喷雾给药(spray-instillation, SI),可明显改变其肺部的药动学(PK)和药效学(PD)参数,并与胰岛素和H-MAP的剂量有关。当H-MAP用量为16mg/kg,胰岛素用量为1.3 u/kg时,获得最大PK及PD参数,相对生物利用度比单独给予胰岛素增加2.5倍,可达到(77 ± 23)%^[8]。另一项H-MAP影响肺功能的单剂量急性毒性实验研究表明,喷雾给药含H-MAP的胰岛素,24h时引起轻微的炎症反应,72h时又恢复正常,同阴性对照组^[9]。

1.3.3 透明质酸

透明质酸,又称玻尿酸或醣醛酸(hyaluronic acid 简称HA)是由双糖单位(N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖醛酸)组成的黏多糖类物质,商品HA通常是其钠盐形式,称之为透明质酸钠。HA广泛存在于动物组织细胞间质和眼玻璃体中,主要的生理功能是保水和润滑。有人采用不同浓度和pH值的低黏度透明质酸,研究了其对重组人胰岛素(rh-insulin)肺部吸收的影响。发现与rh-insulin水溶液相比,在pH7.0时,透明质酸(2.14 × 10⁶)浓度为0.1%、0.2%,均可显著提高rh-insulin的药理生物利用度(pharmacological availability, PAB)。而且,浓度0.1%透明质酸,其促进作用强于浓度为0.2%^[10]。实验同时证明,当透明质酸浓度调至0.47mmol/L时,对胰岛素肺部吸收的促进作用最强,并且与透明质酸的分子量无关。

2 酶抑制剂

酶抑制剂应用于肺部给药系统由来已久。如甲磺酸萘莫司他(nafamostat mesilate, NM)、杆菌肽、胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, STI)、胰凝乳蛋白酶抑制剂(Chymostatin)、内皮素转化酶抑制剂phosphoramidon、氨肽酶抑制剂Bestatin、抑肽酶aprotinin等,它们能降低各种酶的蛋白水解能力,从而促进一些对酶敏感、易降解的大分子药物如胰岛素的吸收。酶抑制剂的用量主要取决于所抑制的酶的种类和所要吸收的多肽的性质。

有实验研究了酶抑制剂对重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)的肺吸收促进作用。研究表明:含蛋白酶抑制剂p-AMF、抑肽酶aprotinin和氨肽酶抑制剂bestatin的rhG-CSF溶液血药浓度-时间曲线下面积AUC 0~8h分别比不含酶抑制剂时增加1.5倍之多^[5]。

另一项实验证明,酶抑制剂对促甲状腺素释放激素(TRH)和胰岛素兔气管渗透促进作用顺序为^[11]:二肽氨肽酶Ⅳ > 亮氨酸-氨肽酶 > 组织蛋白酶B > 胰蛋白酶 trypsin。

3 磷脂和脂质体

脂质体的主要成分是磷脂,磷脂又是生物膜的基本组成部分,因此脂质体以其特有的细胞亲和性、组织相容性、无免疫源性的优势,用于蛋白及多肽类药物给药系统日益引人注目。脂质体促进药物的吸收可能与存在于肺泡表面的活性剂有关,其主要成分是磷脂和低分子量的蛋白类活性剂,它们在体内可以快速更新。外源蛋白质或多肽类脂质体的加入能加快肺泡表面活性剂的更新速度,从而促进了蛋白质类药物向体循环的转运。

最近有用白介素-2(IL-2)人白蛋白脂质体吸入给药治疗癌症,其不良反应较低,病人耐受性较强,胸部X-检查未见肺功能损害^[12]。

江志强等^[13]以皮下注射胰岛素溶液为对照,并同胰岛素溶液肺部给药进行比较。分别采用葡萄糖氧化酶法和放射免疫分析方法测定血糖和血清中胰岛素含量。采用梯形法计算血糖经时变化曲线上面积(AAC)和血清胰岛素水平经时变化曲线下面积(AUC)来评价 ILS 肺部给药后在大鼠体内的药理相对生物利用度(relative pharmacological bioavailability, f)和药物相对生物利用度(F)。以薄膜-超声分散法和逆相蒸发法制备的 ILS 其脂质颗粒平均粒径分别为(1.91 ± 0.94) μm 和(2.08 ± 1.28) μm。包封率分别为(16.4 ± 1.6)%和(40 ± 3)% (n = 3)。肺部给药后 f 均达到 37%, F 均达到 32%,与胰岛素溶液肺部给药后的 f 和 F(分别为 29%和 16%)比较,有显著性差异(P < 0.01)。

吕剑等^[14]同时进行了胰岛素脂质混悬液(insulin lipid suspension, ILS)对肺部损伤的研究。连续 7d 胰岛素磷酸盐缓冲液(IPBS)肺部给药后,大鼠肺水肿明显,可见大面积淤血;而连续 7d 胰岛素脂质混悬液(ILS)肺部给药组中,大鼠肺部未见明显水肿,且大多呈淡粉红色,个别大鼠肺部出现斑点状淤血,程度轻于 IPBS 组;ILS 组的肺水肿指数[湿重(WW)/干重(WD)]显著低于 IPBS 组(表 2)。说明以胰岛素脂质混悬液进行肺部给药可显著降低其磷酸盐缓冲液给药对肺部的损伤程度。

表 2 大鼠给药 7d 后湿/干肺重比 (WW / WD)^[14]($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 2 The pulmonary edema index (WW/WD) after intratracheal instillation for 7 consecutive days ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	WW/WD
正常组	4.69 ± 0.09
IPBS 组	5.89 ± 0.17
ILS 组	5.01 ± 0.13 *

注:与 IPBS 组比较: * P < 0.01

Note: * P < 0.01 vs group IPBS

采用吸收促进剂、酶抑制剂和脂质体技术提高蛋白质及多肽类药物肺部给药系统的生物利用度,已取得一定进展,肺部给药有望成为今后蛋白质及多肽的用药新途径。美国吸入治疗公司和辉瑞公司合作开发的胰岛素的肺部吸入剂已进入Ⅲ期临床研究,有望作为皮下注射胰岛素的替代方法。但是,目前对生物技术药物的研究尚局限于小分子的蛋

白质与多肽,同时,其长期用药的安全性还有待进一步考察。然而,随着更多新颖、安全的吸收促进剂的开发及新的制剂技术和装置的发展与完善,生物利用度的提高,将使更多蛋白质及多肽类药物的肺部给药成为可能。

参考文献

[1] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 85.

[2] Hussain A, Arnold J J, Khan M A, *et al.* Absorption enhancers in pulmonary protein delivery[J]. J Controlled Release, 2004, 94(1): 15.

[3] 沈赞聪, 程驿. 胰岛素肺部给药: 各种吸收促进剂对胰岛素经肺吸收的促进作用[J]. 中国药学(英文版). 2000, 9(1): 22.

[4] Mesiha M S, Ponnappa S, Plakogiannis F. Oral absorption of insulin encapsulated in artificial chyles of bile salts, palmitic acid and alpha-tocopherol dispersions[J]. Int J Pharm, 2002, 249(1-2): 1.

[5] Machida M, Hayashi M, Awazu S. The effects of absorption enhancers on the pulmonary absorption of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(1): 84.

[6] 王智瑛, 张强. 鲑鱼降钙素大鼠肺部给药系统的研究[J]. 北京大学学报, 2003, 35(3): 329.

[7] Shen Z C, Cheng Y, Zhang Q, *et al.* Lanthanides enhance pulmonary absorption of insulin[J]. Biol Trace Elem Res, 2000, 75(1-3): 215.

[8] Uarez S, Garcia Contreras L, Sarubbi D, *et al.* Facilitation of pulmonary insulin absorption by H-MAP: pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats[J]. Pharm Res, 2001, 18(12): 1677.

[9] Garcia Contreras L, Sarubbi D, Flanders E, *et al.* Immediate and short-term cellular and biochemical responses to pulmonary single-dose studies of insulin and H-MAP[J]. Pharm Res, 2001, 18(12): 1685.

[10] Morimoto K, Metsugi K, Katsumata H, *et al.* Effects of low-viscosity sodium hyaluronate preparation on the pulmonary absorption of rh-insulin in rats[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2001, 27(4): 365.

[11] Morimoto K, Uehara Y, Iwanaga K, *et al.* Effects of sodium glycocholate and protease inhibitors on permeability of TRH and insulin across rabbit trachea[J]. Pharm Acta Helv, 2000, 74(4): 411.

[12] Ten R M, Anderson P M, Zein N N, *et al.* Weiss W. Interleukin-2 liposomes for primary immune deficiency using the aerosol route [J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2(2-3): 333.

[13] 江志强, 吕剑. 胰岛素脂质混悬液的肺部给药[J]. 药学报, 2002, 37(5): 378.

[14] 吕剑, 朱颖, 江志强. 胰岛素脂质混悬液肺部给药的生物利用度及对肺部损伤的初步考察[J]. 中国生物药物杂志, 2002, 23(6): 271.

[15] 刘昂, 吴梧桐. 制剂新技术在多肽、蛋白质类药物给药系统研究中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2003, 20(2): 110.

收稿日期: 2004-08-25