

各种薄膜包衣辅料的发展促使了微丸制剂成为口服缓控释剂研究的主要方向之一。并且制备微丸的现代化机械设备的日益先进,近年来对于中药浸膏黏稠度大、不易制丸等情况也取得制备工艺上的改进,证明微丸制剂有很大的发展前景。然而,我国医药工作者仍需尽其所能大力发展国药产业,促进中药制剂现代化进程。

参考文献:

- [1] 张莉,陈大为,高子彬,等. 法莫替丁脉冲控释微丸胶囊的制备及其体外释放[J]. 药品评价,2004,1(5):352.
- [2] 陈盛君,朱家璧. 缓控释微丸制剂的研究进展[J]. 国外医学·药学分册,2004,31(3):177.
- [3] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2001:412.
- [4] 陈庆华,张焱,陆伟根,等. 速释硝苯地平微丸的研究[J]. 中国药理学杂志,1995,30(1):20.
- [5] 郭涛,郑春丽,宋洪涛,等. 双氯芬酸钠脉冲控释微丸的研究[J]. 药学报,2003,38(9):707.
- [6] 施路,李三鸣,宋红光,等. 不同包衣条件下银杏缓释微丸体外释放考察[J]. 沈阳药科大学学报,2005,22(3):176.
- [7] 张涛,束怡,蔡彩霞,等. 复方单硝酸异山梨酯-阿司匹林双缓释微丸胶囊的研制(II)[J]. 武汉大学学报(理学版),2003,49(2):231.
- [8] 陆辛逸. 国内外口服释药微丸的制备及展望[J]. 机电信息,2004,72(12):15.
- [9] 李春花,王丽萍,蔡浩. 尼美舒利缓释微丸胶囊的制备及体外溶出度测定[J]. 中国药事,2005,19(5):294.
- [10] 邹龙贵. 微丸的制备方法简介[J]. 中国医药工业杂志,2005,36(2):127.
- [11] 威秋鹏,王中彦,莫凤奎. 离心造粒法制备中药浸膏微丸的影响因素[J]. 中国医药工业杂志,2004,35(1):25.
- [12] 孙桂芝,曹智华,刘文,等. 维骨康胶囊中微丸制备工艺研究[J]. 中成药,2005,27(4):394.
- [13] 于少云,王洪光,刘璐,等. 微丸的进展[J]. 中国新药杂志,1999,8(12):802.
- [14] 王文刚,崔光华. 挤出滚圆制微丸工艺的进展[J]. 中国新药杂志,2001,10(9):661.
- [15] 王鲁敏,潘家祯. 挤出滚圆法制备纳米中药微丸的工艺研究[J]. 机械工程师,2005,12(5):68.
- [16] 甘立春,胡海燕,杨得坡. 薄膜包衣的成型工艺及其在中药微丸上的应用[J]. 时珍国医国药,2004,15(3):177.
- [17] 沈熊,吴伟,徐惠南. 5-氟尿嘧啶结肠定位释药微丸的研制及释药特性[J]. 中国医药工业杂志,2004,35(3):146.
- [18] 陈修毅,王东凯,顾艳丽. 人参总皂苷磷脂复合物包衣微丸的制备[J]. 中国药理学杂志,2003,38(6):438.
- [19] 钱方,蒋雪涛,王安文. 微丸的进展[J]. 中国医药工业杂志,1996,27(1):41.

收稿日期:2005-11-18

蛋白多肽类药物的药代动力学研究概况

樊蓉¹,张纯¹,高申²(1. 第二军医大学长征医院药理学部,上海 200003;2. 第二军医大学药学院药剂学教研室,上海 200433)

摘要 目的:介绍国内外蛋白多肽类药物的药代动力学研究概况。方法:主要查阅了近年来 CBM、Medline 和 Pubmed 收录的蛋白多肽类药物药代动力学研究有关文献。结果:蛋白多肽类药物的药代动力学具有生物半衰期短、表观分布容积小、首关效应、生物利用度低等特性;其药代动力学的分析方法主要为免疫学分析法(RIA、IRMA、ELISA、FPIA)、同位素标记示踪法、理化分析技术(HPLC、HPCE、LC/MS、LC/MS/MS)和生物检定法。结论:蛋白多肽类药物的药代动力学研究具有特殊性,寻求灵敏度高、专属性强的分析方法是解决问题的关键,免疫学分析法是目前较为实用的蛋白多肽类药物药代动力学的分析方法。

关键词 蛋白质;多肽;药代动力学

中图分类号:R945

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2006)03-0135-04

蛋白多肽类药物的生理活性强,疗效高,在维持机体正常功能中发挥着重要的作用,因此日益受到人们的关注,目前已成为国际药学界研究的热门课题,国内“863 计划”和“十五计划”都将蛋白多肽类药物作为生物医药研究的重点项目,许多研究机构

和厂商竞相将其列为开发的目标。目前,国内外已有许多正在开发或已经上市的蛋白多肽类药物,如环孢素 A、胸腺肽、生长因子、重组人胰岛素和白细胞介素系列等。这些药物具有相对分子量大、不易透过生物膜、易酶解、有多种降解代谢途径等特点,对其药代动力学研究有着重要意义。本文就国内外蛋白多肽类药物的药代动力学研究情况作一概述。

作者简介:樊蓉(1979-),女,硕士研究生。E-mail: fanrong1979@163.com.

1 蛋白多肽类药物的药代动力学特性

1.1 生物半衰期短 蛋白多肽类药物进入体内后可以被酶迅速代谢降解,半衰期通常很短,如血管紧张素 II 的半衰期 < 1min,胰岛素在人体半衰期 < 9min,组织型纤溶酶原激活物(t-PA)为 26 ~ 55min。近年来已有许多学者进行了提高该类生物半衰期的研究,如 Koehler 等^[1]用白蛋白亲和标记物标记抗凝血肽给家兔静脉注射,发现可以增加药物在体内的半衰期。Zobel 等^[2]把一系列磷酸酯连接抗凝血肽的氨基端,以增加肽类在体内的蛋白结合率,结果发现给家兔静脉注射后其肽类的半衰期延长了一倍。

1.2 表观分布容积小 蛋白多肽类药物一般具有较强的亲水性,不易透过生理屏障,表观分布容积相对较小,不同于小分子药物。Russell 等^[3]利用细菌、病毒和毒素的表面分子作为口服蛋白多肽类药物分子的载体,制成靶向制剂以增加肠上皮细胞的定位吸收。此法可以增大蛋白多肽类药物的表观分布容积。

1.3 具有首关效应 蛋白多肽类药物直接口服给药,在经过胃肠道和肝脏时会被部分代谢,使得进入体循环的药量减少。如胰岛素首次经过肝脏有 40% ~ 50% 的药量被清除^[4]。故早期的蛋白多肽类药物往往采用非口服给药,如注射给药、鼻腔给药、眼部给药等。但口服给药是最方便的给药方式,尤其适用于长期用药,所以,研制口服蛋白多肽类药物逐渐成为发展的主要趋势。1998 年 Cortecs 公司推出的降钙素口服剂(商品名 Macritonin)经 II/III 期临床证明,对骨质疏松症有效。

1.4 生物利用度低 由于蛋白多肽类药物的生物半衰期短,加上胃肠道和肝脏的首关效应等原因,其生物利用度通常较低。特别是口服给药,因其分子量大,不易被转运吸收,使其生物利用度更低,一般只有 10% 左右。如:口服多肽 B201 (Darg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Igl-Ser-Digl-Oic-Arg) 的生物利用度仅为 1%^[5];去氨加压素口服的生物利用度为 5%;环孢素 A(CsA)口服在体内吸收缓慢且波动较大,生物利用度有个体差异,为 20% ~ 40%^[6]。为了提高蛋白多肽类药物的生物利用度,可以采取通过化学修饰多肽结构、改变用药途径、改变剂型等方法。Senthil 等^[7]采用蛋白酶抑制剂和吸收促进剂作辅料,以丙烯酸树脂 L-100 作微球包衣,制成的胰岛素口服制剂,较注射用胰岛素有更持久、显著的降血糖作用。而依降钙素用偶氮类共聚物包衣后,可以避免胃肠内的首关效应,并可在蛋白水解酶相对较少

的结肠部位定位释放和吸收^[8]。Vander 等^[9]用 N-三甲基壳聚糖盐酸盐作为吸收促进剂,增加去氨基精加压素的吸收。

2 影响蛋白多肽类药物药动学参数的主要因素

2.1 化学因素的影响 药物本身的化学结构对其药动学行为有着重要的影响。化学结构决定着一系列的理化性质,如 pH 值、粒径大小、晶型等,会影响到药物的溶解、吸收和生物利用度。对药物进行结构修饰或制成前体药物等方法都可以改善药物的药代动力学行为。如血管靶向肽 Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG)与疏水性的聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺共轭,形成改良的 DSPE-PEG-APRPG 脂质体,可以在肿瘤部位有较高的蓄积^[10]。

2.2 个体差异的影响 由于体内代谢酶 P450 和 CYP3A4 的类型和含量不同,不同种系动物、不同人群多肽类药物的药代动力学行为有所差别。即使同种系不同个体之间,其吸收、分布、代谢、排泄过程也有差异。如 Pettersson 等^[11]曾报道大鼠的肠循环时间比豚鼠短 4 ~ 5h。

2.3 制剂因素的影响 不同的剂型和不同的给药方式都会影响到药物药动学行为。通过喷雾和皮下注射两种方式给血糖正常的人用胰岛素,发现喷雾剂型的胰岛素有更高的血药浓度和更短的达峰时间^[12]。静脉给药时,药物可以直接入血,起效快,达峰时间较短。肌注给药需要一个吸收过程,作用较静脉给药慢,但作用会更持久。鼻腔给药和透皮给药可以避免首关效应,提高生物利用度。现代靶向和控释等定位释放制剂是目前研究开发的热点。

2.4 疾病因素的影响 在处置药物的过程中,肝脏主代谢,肾脏主排泄,肝肾疾病会增加药物蛋白结合率,因此药物在患有肝肾疾病的病人体中清除时间会明显延长。给正常人和有肾功能受损的人分别注射依替巴肽,肾损伤病人总清除率几乎减少 50%,血药浓度为正常人的 2 倍^[13]。

2.5 内源性物质的干扰 许多蛋白多肽类药物本身也是机体存在的物质,给药后内源性物质(如胰岛素,甲状腺素,细胞因子,自身产生的抗体等)和外源性物质共存,掺杂在一起不易区分,同时内源性物质会对外源性物质产生干扰,所以在进行药代动力学研究时须对内源性物质加以控制和干预。

3 蛋白多肽类药物药代动力学研究的分析方法

蛋白多肽类药物的用药剂量小,血药浓度低(通常在 pg/mL 或 ng/mL 水平),加之易受内源性物质干扰,进行体液药物浓度测定和开展药代动力

学研究工作有较大难度。因此,选择灵敏度高且专属性强的药物分析方法至关重要。目前,已有多种蛋白多肽类药物的分析方法,但每种方法各有利弊,在分析蛋白多肽类药物时应根据具体情况进行选择。

3.1 免疫学分析法 是基于待测蛋白多肽类药物的抗原性,用针对某种蛋白多肽的特异性抗体来定量和定性检测的方法,具有快速、灵敏、特异性强、准确度高等优点。但不能鉴别具有与原药相同决定簇的代谢产物,可受内源性结合蛋白、抗体等干扰。

自从1959年 Yalow 和 Berson 将放射性同位素示踪技术的高灵敏度与抗原-抗体免疫学反应的高特异性结合建立胰岛素 RIA(放射免疫测定法)以来,此方法就不断被使用和发展,其中包括非特异性多克隆抗体法(NSRIA)和特异性单克隆抗体法(SRIA)。但存在设备及放射性废物处理和防护等问题,将会逐渐被其他方法所替代。与之类似的免疫放射测定法(IRMA)虽然有快速、特异性强的优点,但是需要用放射性核素来定量,有潜在的危险,所以同 RIA 法一样受到限制。

目前常用的免疫学方法有酶联免疫吸附法(ELISA)和荧光偏振免疫测定法(FPIA)。前者重复性好,无放射性,很适合人体药代动力学的研究,虽然其试剂盒价格昂贵,不同厂家抗原抗体结合反应可能有较大差别,但仍是目前临床上最常用的药代动力学研究检测方法。Yinuo 等^[14]用此法测定了灌流液中人胰岛素的浓度,此外还可以用来测定其他标记后的蛋白多肽类物质,如新蝶呤、血清淀粉A、IL-6、淋巴毒素(lymphotoxin)、IL-2、干扰素- λ 、干扰素- α 和IL-2受体。后者由 Abbott 公司早在20世纪80年代就将其应用于药物浓度的测定,自动分析系统为 TDx。包括单克隆抗体荧光偏振免疫法(MAFPIA)和多克隆抗体荧光偏振免疫法(PFPIA)。在国内外已有的报道中环孢素A(CsA)主要测定方法为 FPIA 和 HPLC,其中用 FPIA 法的文献数约为文献总数的2/3。

此外还有时间分辨荧光免疫测定法(TRFIA)、高灵敏度(HS)2ELISA、酶免疫测定法(EIA)等。

3.2 同位素标记示踪法 是在被测的生物制品上标记同位素,借此区别于内源性物质,可用于药物的组织分布研究,但该方法会干扰表皮生长因子与细胞的相互作用而导致体内清除紊乱^[15],且不能识别原型药物和降解药物,需与其他分离技术方法一起使用。常用的有凝胶色谱法(GHPLC)、反向色谱法(RHPLC)、分子筛色谱法(SHPLC)、离子色谱法(GPIEC)、电泳法等。同位素标记示踪法具有灵敏

度高、操作简便、快速、精密度高、专属性强等优点,但无法应用于人体,可能存在放射性污染,不能区分蛋白药物的活性与非活性形式。较早用于同位素标记的元素有³H、¹⁴C、³⁵S,但制备纯化复杂,成本高,目前已很少使用。¹²⁵I 比放射性高,制备简单,半衰期短,被认为是较理想的同位素标记元素,应用广泛。早在1990年 Park 就开始用¹²⁵I 来标记多肽和蛋白质,后来陆续出现了¹¹C、^{99m}Tc、¹⁸F、⁶⁴Cu 等同位素标记元素。

3.3 理化分析技术 近10年来发展起来的分离分析多肽类药物的高效液相色谱法(HPLC),具有适应性好、重现性好和操作方便的特点。所用的HPLC法有反向色谱、离子交换色谱、凝胶过滤色谱、亲和色谱等,其中以反向色谱(RP-HPLC)最为常用。Fosset 等^[16]用 RP-HPLC 和 ELISA 联合分析 Phe-CMP-1P。

高效毛细管电泳法(HPCE)是将电泳技术和色谱技术相结合的一项新的分析技术。具有分离效率高(每米理论塔板数可达 $10^6 \sim 10^7$)、速度快(20~30min完成分析)、样品用量少(仅为纳升级)、灵敏度高(检测限可达 1×10^{-24} mol)、成本低、环境污染小等优点。常见分析蛋白多肽类的类型有毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等速电泳(CITP)和毛细管电色谱(CEC)。

蛋白多肽类药物相对于传统药物给药量小,吸收后血药浓度低,检测限常需要达到 ng/mL 级。液质联用技术(LC/MS 和 LC/MS/MS)能够检测出生物样品中的痕量组分,灵敏度高,专属性强,分析速度快,是近5年发展起来的药代动力学分析方法。其检测限可以达到 0.1 ng/mL。Yin 等^[17]用 LC/MS 测定小鼠血浆中噻可拉林的浓度, Feng 等^[5]用 LC-MS/MS 电喷射测定小鼠血浆中的多肽 B201(NSC710295), Stokvis 等^[18]用 LC-MS/MS 电喷射方法测定人血浆中的缩酚酸肽抗癌药。

3.4 生物检定法 是用体内模型、体外组织、细胞或酶等体系测定生物制品的特异性生物学反应,通过剂量或浓度-效应曲线对被分析物定量的方法。可以测定体液中的药物浓度和标记药物的生物活性,在蛋白多肽类药物活性测定中具有重要地位。如 EPO 体外活性测定可采用生长代谢要依赖培养液中 EPO 的依赖细胞株 UT-7/EPO,其代谢的活跃程度正比于 MTT 还原产物(蓝紫色)的生成量,通过测定 MTT 还原产物的光密度(A 值)即可得出 EPO 活性的高低^[19]。不足之处是无法描述药物在体内的代谢过程,无法定量非活性降解代谢产物。

4 展望

蛋白多肽类药物以其独特的疗效而被世人关注,近几年的蛋白多肽类药物市场快速增长。寻求吸收好、生物利用度高、靶向性好的蛋白多肽类药物已成热门课题。由于蛋白多肽类药物的药代动力学有其特殊性,因此,对蛋白多肽类药物的药代动力学及其分析方法的研究显得尤为重要。理想的药代动力学研究分析方法应具备下列条件:①在人和动物试验都能适用;②特异性强,能避免其他成分的干扰;③灵敏度高,最低检测限应能满足测定3~5个消除半衰期时药物浓度;④重现性好,其精密度试验的RSD应小于15%;⑤操作较简便,易于推广应用。但目前蛋白多肽类药物药代动力学的分析方法还不够尽善尽美。相对而言,免疫学分析法是目前较为实用的蛋白多肽类药物药代动力学的分析方法,然而,免疫学分析法仍存在“假阳性”现象以及免疫药盒差异现象。如能通过一定的分离或“灭活”手段,可避免此类现象的发生。高效毛细管电泳法,以及液质联用技术等理化分析技术的不断丰富,可进一步补充和完善蛋白多肽类的分析方法,而当务之急是研制更灵敏的检测器和更通用的接口,使之更加灵敏、精确、操作更加简便。随着生物技术的不断发展和药代动力学方法学的不断进步,相信蛋白多肽类药物的发展一定会有更好的明天。

参考文献:

- [1] Koehler MF, Zobel K, Beresini MH, *et al.* Albumin affinity tags increase peptide half-life *in vivo* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12(20): 2883.
- [2] Zobel K, Koehler MF, Beresini MH, *et al.* Phosphate ester serum albumin affinity tags greatly improve peptide half-life *in vivo* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(9): 1513.
- [3] Russell J. Use of targeting agents to increase uptake and localization of drugs to the intestinal epithelium [J]. *Drug Target*, 2004, 12(2): 113.
- [4] Brody TM, Lamer J, Minnerman KP. *Human Pharmacology: Molecular to Clinical* [M]. 3rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1998, 548-549.
- [5] Feng WY, Chan KK, Covey JM. Electrospray LC-MS/MS quantitation, stability, and preliminary pharmacokinetics of bradykinin antagonist polypeptide B201 (NSC 710295) in the mouse [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2002, 28(3-4): 601.
- [6] Pacor mL, Dilorenzo G, Martinelli N, *et al.* Comparing tocolimas ointment and oral cyclosporine in adult patients affected by atopic dermatitis: a randomized study [J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(2Suppl): 396s.
- [7] Senthil RD, Mandal UK, Veeran GK, *et al.* Oral delivery system of insulin microspheres: effect on relative hypoglycemia of diabetic albino rats [J]. *Boll Chim Farm*, 2004, 143(8): 315.
- [8] Hideyuki T, Junko N, Junta K, *et al.* Enhanced absorption of insulin and (Asu1, 7) Eel-Calcitonin using novel Azopolymer-coated pellets for colon-specific drug delivery [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 90(1): 89.
- [9] VanderMerwe SM, Verhoef JC, Kotze AF, *et al.* N-trimethyl chitosan chloride as absorption enhancer in oral peptide drug delivery. Development and characterization of minitab and granule formulations [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57(1): 85.
- [10] Maeda N, Takeuchi Y, Takada M, *et al.* Synthesis of angiogenesis-targeted peptide and hydrophobized polyethylene glycol conjugate [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14(4): 1015.
- [11] Pettersson G, Ahlman H, Kewenter J. A comparison of small intestinal transit times between the rat and guinea-pig [J]. *Acta Chir Scand*, 1976, 142(7): 537.
- [12] Simona C, Miriam K, Jay W, *et al.* Comparison of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of Single-Dose oral insulin spray and subcutaneous insulin injection in healthy subjects using the euglycemic clamp technique [J]. *Clin Ther*, 2004, 26(12): 2084.
- [13] Gretler DD, Guerciolini R, Williams PJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of eptifibatid in subjects with normal or impaired renal function [J]. *Clin Ther*, 2004, 26(3): 390.
- [14] Yinuo P, Masahiro S, Peter R. The pharmacokinetics of pulmonary insulin in the *in vitro* isolated perfused rat lung: Implications of metabolism and regional deposition [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 25(4-5): 369.
- [15] Kuo BS, Nordbloro GD, Wright DS. Perturbation of epidermal growth factor clearance after radiopiodination and its implications [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997, 86(3): 290.
- [16] Fosset S, Fromentin G, Gietzen DW, *et al.* Peptide fragments released from Phe-caseinomacropeptide *in vivo* in the rat [J]. *Peptides*, 2002, 23(10): 1773.
- [17] Yin J, Aviles P, Lee W, *et al.* Validation of a sensitive assay for thiocoraline in mouse plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 794(1): 89.
- [18] Stokvis E, Rosing H, Lopez-Lazaro L, *et al.* Quantitative analysis of the novel depsipeptide anticancer drug Kahalalide F in human plasma by high-performance liquid chromatography under basic conditions coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Mass Spectrom*, 2002, 37(9): 992.
- [19] 严洁, 胡蓓, 江骥. 生物制品药动学研究中的药物分析方法. *中国药学杂志*, 2005, 40(13): 967.

收稿日期: 2005-09-09