

蛋白类药物缓释微球制剂的研究进展

吕丕平^{1,2}, 王玉霞^{1*}, 崔一民³, 梁晓东⁴, 和龙⁴, 马光辉^{1*}

(1. 中国科学院过程工程研究所, 生化工程国家重点实验室, 北京 100190; 2. 北京辉粒科技有限公司, 北京 100190; 3. 北京大学第一医院药剂科, 北京 100034; 4. 国药一心医药研发(北京)有限公司, 北京 100176)

【摘要】目的: 总结蛋白类药物临床应用中的问题, 以及现有的解决策略, 以加快蛋白类药物的临床应用。**方法:** 通过文献调研, 笔者综述了现有微球制剂常用的材料、制备技术及目前存在的问题。**结果与结论:** 介绍一种可制备尺寸均一且粒径可控载药微球的新型膜乳化技术, 有望提高我国微球制剂的质量, 具有广阔的发展应用前景。

【关键词】 蛋白质药物; 微球制剂; 临床应用; 高分子材料; 膜乳化剂技术

【中图分类号】 R944

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-3384(2015) 03-0005-05

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2015.03.002

Research progress of sustained-release system of proteinic drug

LV Pi-ping^{1,2}, WANG Yu-xia^{1*}, CUI Yi-min³, LIANG Xiao-dong⁴, HE Long⁴, MA Guang-hui^{1*}

(1. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. Beijing Huili Science and Technology Co., Ltd, Beijing 100190, China; 3. Pharmacy Department, Peking University First Hospital, Beijing 100134, China; 4. Sinopharm A-THINK Pharmaceutical Research & Development(Beijing) Co., Ltd, Beijing 100176, China)

【Abstract】 Objective: To accelerate the clinical application of bioactive proteins and peptides, we summarized the existing problems and current solutions. **Methods:** The common materials, preparation technology and existing problems of microsphere delivery system were reviewed in this paper. **Results and Conclusion:** We propose a new membrane emulsification technique for preparing uniform-sized and size-controllable microspheres, which is expected to improve the quality of microsphere formulations in China and presents a broad application prospect.

【Keywords】 protein drugs; microsphere formulations; clinical application; research progress; membrane emulsification technique

随着现代生物技术、基因组学以及组合化学的迅速发展, 越来越多的蛋白质类药物(蛋白质、多肽、酶、激素、疫苗、细胞生长因子及单克隆抗体等)被大规模地生产出来用于人类各种疾病的治疗。据统计, 2012年美国食品药品监督管理局(FDA)批准了各种蛋白质类药物12个^[1], 为1993年以来批准数量最多的一年, 其市场年销售额高达1 246.2亿美元, 预计这一数字2025年将突破3 000亿美元^[2]。尽管如此, 这些药物在单独给药时, 还存在如半衰期短、需频繁注射给药、体内稳定性差和生物利用度低等问题^[3]。为了解决上述问题, 国际上普遍采用的方法是应用药物载体系统, 将药物以某种形式包埋或偶联在大分子上进行给药, 让其在体内实现

缓慢释放, 这样不仅能够保持体内血药浓度恒定, 延长药物的治疗时间, 而且还能保护药物免受降解^[4]。同时, 选择合适的高分子材料作为药物载体膜材, 还可以增强载体的亲脂性, 提高其生物利用度^[5]。在众多的药物载体中, 由生物可降解高分子材料制备而成的载药微球递送系统是近十多年来各国学者和制药企业大力研究的新领域^[6]。笔者综述了近年来蛋白类药物缓释微球制剂的研究进展。

1 常用的微球制剂材料

作为药物释放体系载体, 载药微球材料应满足以下性能要求^[7]: ①具有优良的生物相容性(血液相容性、组织相容性及无免疫原性), 无毒, 不致

【收稿日期】 2014-05-20

【作者简介】 吕丕平, 男, 博士, 研究方向: 药物制剂

【通讯作者】 *王玉霞, 女, 副研究员, 研究方向: 药物制剂, Tel: (010) 82545002, E-mail: yxwang@ipe.ac.cn

*马光辉, 女, 研究员, 研究方向: 生物制剂与生物材料, Tel: (010) 82627072, E-mail: ghma@ipe.ac.cn

畸,且降解后产物对细胞无毒害作用,不引起炎症和突变反应;②具有良好的生物降解性,降解时间和药物释放速率应根据要求进行调控;③高分子的降解必须要发生在一个合理的期间内;④具有一定的机械强度,可用常规方法加工成型;⑤制备工艺简单;⑥原料来源丰富,价格便宜,适合大规模应用。作为蛋白质多肽类药物载体还必须满足不易使蛋白质药物失活的特殊要求。

用于包埋蛋白质、多肽、核酸、疫苗等活性物质或其他药物的可生物降解高分子材料很多,按照其来源可分为天然高分子材料、半合成高分子材料和全合成高分子材料。

1.1 天然高分子材料

天然高分子材料是最常用的膜材和载体材料,包括明胶、阿拉伯胶、海藻酸盐、壳聚糖、蛋白类、淀粉等,其特点是来源广泛、价格低廉、性质稳定、无毒、可生物降解、成膜性和成球性好^[8-9]。但是天然高分子材料可能存在的免疫原性和杂质限制了其在微球长效缓释体系中的发展。

1.2 半合成高分子材料

用于微球制备的半合成高分子材料多系纤维素衍生物^[10-11],如羧甲基纤维素、邻苯二甲酸醋酸纤维、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙甲纤维素、丁酸醋酸纤维素、琥珀酸醋酸纤维素等。其特点是毒性小、黏度大、成盐后溶解度增大;由于易水解,故不宜高温处理,需临时现配。

1.3 全合成高分子材料

与天然材料相比,合成材料具有原料来源丰富、结构和性能可人为修饰和调控等优点,近20年来发展迅速。聚乳酸(PLA)^[12]和聚羟基乙酸(PGA)^[13]是最典型的合成可生物降解聚合物,无毒、无免疫刺激性、具有很好的生物降解性和生物相容性。1970年,PLA和PGA首次被制备出来用于手术缝合线,由于这种材料具有良好的生物降解性,可以在体内通过聚酯水解降解成乳酸和羟基乙酸,进而转化为二氧化碳和水代谢排出体外,不需要像以前非可生物降解型材料必须通过手术取出来,因此得到了广泛的关注。1997年,FDA正式批准聚乳酸羟基乙酸(PLGA)作为可生物降解材料用于药物辅料,PLGA已成为目前研究最广泛、应用最多的可生物降解高分子材料^[14-17]。截止目前,FDA已批准了8种可注射

微球剂型药品^[18-20](表1),所用微球制剂辅料均为PLGA。其中,达必佳(Decapeptyl)由法国Ipsen公司开发,1986年上市,1989年进入美国市场,可缓释一个月,是第一个多肽微球产品。醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)长效PLGA注射微球由日本武田化学公司开发,1989年进入美国市场。Genentech Inc.公司利用Alkermes公司开发的Prolease[®]工艺开发了包埋重组人生长激素的PLGA-rhGH微球缓释剂。此外,采用生物可降解微球载体对重组人表皮生长因子、人胰岛素等蛋白质药物的包埋也正在研究之中。

2 高分子微球的制备方法

2.1 喷雾干燥法

喷雾干燥法(spray drying method)^[21-22]是将需要包埋的蛋白类药物均匀溶解在内水相中,PLGA等聚合物溶解于有机溶剂中,制备成W/O/W型复乳液后再以雾化状态在惰性气流(PLGA等聚酯类高分子聚合物对高温敏感,一般不采用热空气喷雾)中干燥,使乳滴中的溶剂迅速蒸发,实现对药物的包埋。目前,应用该技术生产的重组人生长激素(rhGH)PLGA微球制剂Nutropin Depot[™]已于1998年获准上市,是第一个rhGH的缓释制剂。该制剂使rhGH缺乏患者的给药频率从一个星期给药2次降低为一个月给药1次。尽管喷雾干燥法制备微球效率较高,易于放大生产,但其制备过程非常复杂,受外界环境的影响因素较严重。而且,制备过程中的高温还会造成微球间的粘连以及敏感蛋白质药物的变性失活。更重要的是,所制备的微球粒径不可控,且均一性较差,会导致药物释放一致性差和制备重复性差等问题。

表1 美国FDA批准上市的微球剂型药品

商品名	药物	类型	厂商	上市时间	所用材料
Vivitrol	纳曲酮	小分子	Cephclon	2006	PLGA
Plenaxis	Abarelix	多肽	Praecis	2004	PLGA
Risperdal Consta	利培酮	小分子	强生	2002	PLGA
Nutropin	生长激素	蛋白	基因泰克	1998	PLGA
Sandostatin	奥曲肽	多肽	诺华	1998	PLGA
Lupron/Enantone	亮丙瑞林	多肽	武田	1995	PLGA
Profact	布舍瑞林	多肽	安万特	1986	PLGA
Decapeptyl/Trelstar	曲普瑞林	多肽	Ipsen	1986	PLGA

2.2 凝聚法 (coacervation)

凝聚法又称相分离法, 是指将药物与高分子材料相互混合后, 药物和材料在一定外界因素刺激下会发生两相的分离, 载体高分子材料从溶液析出包裹药物的过程。首先将蛋白类药物的溶液分散在高分子材料的有机溶剂中, 充分混悬, 通过减小混悬液中基质的溶解度, 以使混悬液发生凝聚或相分离, 从而生成类似凝胶体的凝胶粒^[23]。高分子材料沉积在药物颗粒或者囊心表面形成微球, 小的微球通过凝聚又可以形成大的微球, 最后微球固化形成载药微球。通过该技术生产的曲普瑞林微球缓释制剂^[24]达菲林[®]也于 1986 成功上市, 给药频率从每天注射 1 次减小至每 4 周注射 1 次, 大大提高了患者的耐受。

2.3 复乳溶剂蒸发法

复乳溶剂蒸发法是目前蛋白质类药物缓释微球制剂领域最普遍的制备技术, 蛋白类药物具有良好的水溶性, 脂溶性的 PLGA 无法实现对此类药物的直接包埋。通过 W/O/W 复乳溶剂蒸发法可解决这一难题, 即首先将药物的水溶液与溶解有 PLGA 的二氯甲烷溶液混合, 通过均质或者超声等方法乳化形成 W/O 初乳。再将制备好的初乳加入外水相中形成 W/O/W 复乳。最后通过溶剂挥发技术制得 PLGA 微球, 实现对药物的包埋^[25]。通过该方法制得的醋酸亮丙瑞林缓释微球制剂——抑那通于 1989 年在美国成功上市。我国丽珠集团和上海医药工业研究院合作, 经过 10 余年自主研发, 首家开发出了国产注射用醋酸亮丙瑞林原料、缓释辅料与缓释微球制剂, 于 2009 年 8 月通过国家监管部门生产注册批准, 填补了国内此项产品和技术的空白。

2.4 现有缓释微球制剂存在的问题

通过上述这些方法制备的微球大小参差不齐, 粒径分布较宽 (图 1), 这不仅导致产品批次间制备重复性不佳, 在制备的过程中需要筛分, 造成资源的浪费, 而且微球粒径的不均一会使药物释放行为不一致, 进一步导致给药后患者体内的血药浓度不平稳, 影响药效^[26]。此外, 通过喷雾干燥法能消耗较高, 很容易导致蛋白质类药物的失活, 进一步降低药效。而凝聚法在制备过程需要多种有机溶剂, 残留的有机试剂去除比较困难。通过相分离法制得的载药颗粒容易发生凝聚结块, 大规模生产困难。因此, 发展能耗低、易于放大、且可制得粒径均一

微球的制备方法是亟待解决的问题。

2.5 新技术在微球制剂中的运用

微孔膜乳化技术^[27]是近年来在乳液制备方面发展的一项新技术, 其原理见图 2。分散相 (disperse phase) 在氮气压力作用下被缓慢压入膜孔, 在膜孔出口处, 当所形成的乳液滴达到一定大小后便在各种力的作用下脱离膜孔表面进入到连续相 (continuous phase)。膜乳化技术具有如下优点^[28]: ①耗能非常低, 有利于节约能源; ②反应条件温和, 适合包埋一些对剧烈条件敏感的物质, 尤其是蛋白质和多肽类药物; ③通过该技术制备的乳状液粒径非常均一, 而且粒径可以通过膜孔径加以控制; ④液滴粒径等基本不受搅拌桨形状、搅拌速率的影响, 整个过程操作简便, 易于放大。

实验室^[29-35]采用膜乳化技术已开发出了多种药物 (如蛋白质、多肽和难溶性抗癌药) 的微球制剂 (图 3A), 以及具有自主知识产权的工业级膜乳化器 (图 3B)。例如, 实验室通过膜乳化技术制得的曲普瑞林缓释微球粒径非常均一 (图 4A), 突释现象较市售缓释制剂 (达菲林) 有明显减弱 (图 4B), 这有利于降低给药后由于突释带来的副作用, 保持患者体内血药浓度的平稳。另外, 该团队开发的其他多肽 (如艾塞那肽、亮

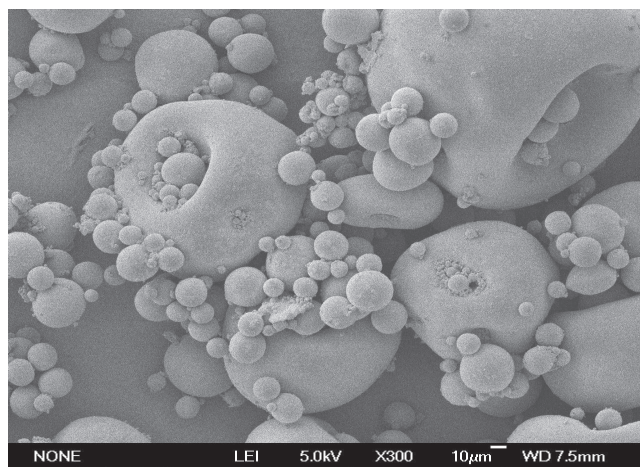


图 1 某市售缓释微球制剂电镜观察 ($\times 300$)

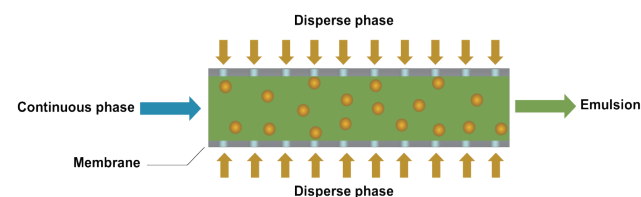


图 2 膜乳化流程示意

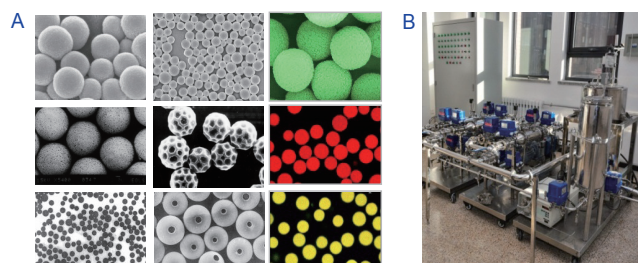


图3 膜乳化技术

A- 基于膜乳化技术开发的尺寸均一微球产品；B- 用于生产尺寸均一微球产品的制备型膜乳化器

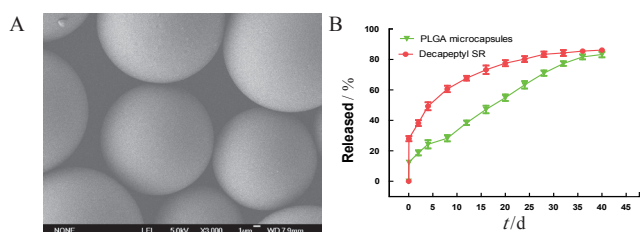


图4 曲普瑞林缓释微球的电镜照片 (A) 及其与商品化达菲林比较释放性能 (B)

丙瑞林等) 和蛋白类 (生长激素、胰岛素等) 药物缓释微球制剂也得到了一致的结果。同时, 膜乳化技术也得到了国内外学者的高度评价, Nazir 等^[36] 评价: 该技术具有操作简便、工业上易于放大、生产速率快、可实现连续分批生产等优点, 具有广阔的市场前景。

3 展望

多肽、蛋白质类药物的缓释微球制剂技术的研究已经取得了重大进展, 但当前研制的微球制剂仍存在粒径不均一、稳定性差、包封率低和突释现象严重等很多亟待解决的问题。新的膜乳化技术不断运用于蛋白质、多肽类微球制剂上, 影响多肽、蛋白质类药物广泛应用的各种因素也将会不断被克服。因此, 多肽、蛋白质类制剂将会有更广阔的应用前景。

【参考文献】

- [1] Mullard A. 2012 FDA drug approvals [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(2): 87-90.
- [2] Merie L. Blockbuster biologics [N]. R&D pipeline news, 2013, 1 (1): 1-3.
- [3] Renukuntla J, Vadlapudi A D, Patel A, et al. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins[J]. Int J Pharm, 2013, 447(1/2): 75-93.
- [4] Tan M L, Choong P F M, Dass C R. Recent developments in

- liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery[J]. Peptides, 2010, 31(1): 184-193.
- [5] Park K, Kwon I C, Park K. Oral protein delivery: current status and future prospect[J]. Reac Funct Polym, 2011, 71(3): 280-287.
- [6] Luo Y C, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery[J]. Int J Bio Macromol, 2014, 64 (3): 353-367.
- [7] Kumari A, Yadav S K, Yadav S C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems[J]. Colloid Surfaces B, 2010, 75(1): 1-18.
- [8] Soliman M S, Behzad T. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches[J]. Pharm Dev Tech, 2014, 2(3): 33-35.
- [9] Hua X, Tan S N, Bandara H M H N, et al. Externally controlled triggered-release of drug from PLGA micro and nanoparticles [J]. Plos One, 2014, Doi:10.1371/journal.pone.0114271.
- [10] Butun S, Ince F G, Erdugan H, et al. One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(2): 636-643.
- [11] Shaji J, Patole V. Protein and peptide drug delivery: oral approaches[J]. Indian J Pharm Sci, 2008, 70(3): 269-277.
- [12] Lassalle V, Ferreira M L. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation[J]. Macromol Biosci, 2007, 7(6): 767-783.
- [13] Floyd J A, Galperin A, Buddy D R. Drug encapsulated polymeric microspheres for intracranial tumor therapy: a review of the literature [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2015, Doi: 10.1016/j.addr.2015.04.008.
- [14] Hirenkumar K M, Steven J S. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier[J]. Polymers, 2011, 3(3): 1377-1397.
- [15] Orive G, Gascón A R, Hernández R M, et al. Techniques: new approaches to the delivery of biopharmaceuticals[J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(7): 382-387.
- [16] 张景环, 朱坚. 蛋白质、多肽类药物新型释药系统的研究 [J]. 临床药物治疗杂志, 2010, 8(5):38-41.
- [17] 孙丽君, 全东琴, 冯端浩. 蛋白多肽类药物注射缓控释制剂的研究进展 [J]. 中国药物应用与监测, 2008, 5(3): 33-36.
- [18] Hoffman A S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems[J]. J Controlled Release, 2008, 132(3): 153-163.
- [19] Wright J C, Hoffman A S. Historical overview of long acting injections and implants[B]. Adv Deliv Sci Technol, 2012, chapter2: 11-24.
- [20] Bhavesh B P, Subhashis C. Biodegradable polymer: An emerging excipient in pharmaceutical and medical device industry [J]. J Excipient Food Chem, 2013, 4(4): 126-157.
- [21] Tanja P I, Lidija P T, Anita G, et al. From optimization of synbiotic microparticles prepared by spray-drying to development of new functional carrot juice [J]. Chem Ind Chem Eng Q, 2014, 20 (4): 549-564.
- [22] Sansone F, Mencherini T, Picerno P, et al. Microencapsulation

- by spray drying of *Lannea microcarpa* extract: technological characteristics and antioxidant activity [J]. *J Pharm pharmacol*, 2014, 2 (4):100-109.
- [23] Gombotz W R, Wee S F. Protein release from alginate matrices[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(12): 194-205.
- [24] Wischke C, Schwendeman S P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles[J]. *Int J Pharm*, 2008, 364(2): 298-327.
- [25] Naik J B, Lokhande M, Kulkarni R D. Development of sustained release micro/nanoparticles using different solvent emulsification technique: a review[J]. *Int J Pharm Bio Sci*, 2012, 3(4): 573 -590.
- [26] Wang L Y, Ma G H, Su Z G. Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug[J]. *J Controlled Release*, 2005, 106(1-2): 62-75.
- [27] Charcosset C, Limayem I, Fessi H. The membrane emulsification process-a review[J]. *J Chem Technol Biot*, 2004, 79(3): 209-218.
- [28] Liu R, Meng F T, Ma G H, et al. Preparation of uniform-sized PLA microcapsules by combining Shirasu Porous Glass membrane emulsification technique and multiple emulsion-solvent evaporation method[J]. *J Controlled Release*, 2005, 103(1): 31-43.
- [29] Wei Q, Tian R, Ma G H, et al. Preparation of uniform-sized PELA microspheres with high encapsulation efficiency of antigen by premix membrane emulsification[J]. *J Colloid Interf Sci*, 2008, 323(2): 267-273.
- [30] Wei W, Wang L Y, Yuan L, et al. Preparation and application of novel microspheres possessing autofluorescent properties[J]. *Adv Funct Mater*, 2007, 17(16): 3153-3158.
- [31] Lv P P, Ma Y F, Y u R, et al. Delivery of insoluble cargo (Paclitaxel) by PEGylated chitosan nanoparticles grafted with Arg-Gly-Asp (RGD)[J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(6): 1736-1747.
- [32] Wei W, Lv P P, Ma G H, et al. Codelivery of mTERT siRNA and paclitaxel by chitosan-based nanoparticles promoted synergistic tumor suppression[J]. *Biomaterials*, 2013, 34 (15): 3912-3923.
- [33] Liu S Y, Wei W, Ma G H, et al. Nanoparticles-based multi-adjuvant whole cell tumor vaccine for cancer immunotherapy[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(33): 8291-8300.
- [34] Wei W, Wang L Y, Ma G H, et al. Monodisperse chitosan microspheres with interesting structures for protein drug delivery[J]. *Adv Mater*, 2008, 20(12):2292-2296.
- [35] Wei W, Wang L Y, Ma G H, et al. Preparation and application of novel microspheres possessing autofluorescent properties[J]. *Adv Funct Mater*, 2007, 17(16): 3153-3158.
- [36] Nazir A, Schroen K, Boom R. Premix emulsification: a review [J]. *J Membrane Sci*, 2010, 362(2): 1-11.

结直肠癌肝转移的诊断与治疗进展

肖艳琼¹, 陈潇², 张涛^{1*}

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400016; 2. 石柱县人民医院肿瘤科, 重庆 400910)

【摘要】目的: 综述结直肠癌肝转移的诊断与治疗进展。**方法:** 查阅国内外公开发表的文献进行综述。**结果与结论:** 结直肠癌是临床常见的恶性肿瘤, 结直肠癌肝转移是影响结直肠癌预后的主要因素。传统上, CT 最常用于结直肠癌肝转移的术前评估与分期。结直肠癌肝转移的治疗目前提倡综合治疗, 以手术为核心, 辅以化疗、靶向治疗、局部治疗等。结直肠癌肝转移的治疗进步一直得益于多学科综合治疗水平的提高和发展。

【关键词】 结直肠癌; 肝转移; 诊断; 治疗

【中图分类号】 R735.3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-3384(2015)03-0009-05

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2015.03.003

Progress in diagnosis and treatment of colorectal cancer liver metastasis

XIAO Yan-qiong¹, CHEN Xiao², ZHANG Tao^{1*}

[收稿日期] 2015-01-20

[基金项目] 重庆市渝中区科技计划项目 (20110323) 和国家临床重点专科肿瘤学建设项目 (国卫办医函 [2013]544 号)

[作者简介] 肖艳琼, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 恶性肿瘤的综合治疗, E-mail: xiaoyanqiong008@163.com

[通信作者] * 张涛, 男, 副主任医师, 研究方向: 恶性肿瘤的综合治疗, E-mail: tumorzzt@163.com