

转铁蛋白在蛋白多肽药物口服给药中的应用

谢向阳¹, 张建维², 迟 强¹, 梅兴国^{1*}

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 河北医科大学药学院; 河北 石家庄 050017)

摘要: 转铁蛋白作为一种药物载体, 在蛋白多肽药物的口服给药领域有着美好前景。以转铁蛋白作为药物载体, 可以使蛋白肽类药物在肠道吸收; 对转铁蛋白进行适当的修饰, 可以提高其递送效率。本文概述了近年来转铁蛋白在蛋白多肽药物口服给药中的作用及有关转运机制的研究进展。

关键词: 转铁蛋白; 投药, 口服; 蛋白; 肽类; 药物载体; 药物释放系统

中图分类号: R943.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-0440(2008)02-0133-03

Transferrin in peroral delivery of protein and peptide

XIE Xiang-yang¹, ZHANG Jian-wei², CHI Qiang¹, MEI Xing-guo¹

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: The utilization of transferrin as a carrier in peptide and protein peroral drug delivery is a promising approach. Using transferrin as a drug carrier can render the absorption of peptide and protein in gastrointestinal tract. Modified transferrin will increase its drug delivery efficiency. In this paper, the progress of transferrin applied in protein and peptide peroral delivery is reviewed, and the transportation mechanism of transferrin is also discussed.

Key words: transferrin; administration, oral; protein; peptides; drug carrier; drug delivery systems

随着生物技术的发展, 具有生物学活性的蛋白多肽分子被不断发现和开发上市。与化学药物相比, 蛋白多肽类药物具有作用靶点单一, 不良反应少, 药效作用强等特点, 故其在现代疾病的预防和治疗中的应用日益广泛。但由于蛋白多肽类药物大多不稳定且非注射给药生物利用度低, 其常规给药途径一直以注射为主。尤其对慢性疾病的治疗而言, 需要长期频繁注射给药, 这给患者带来了诸多不便。口服给药是一种方便并使患者依从性提高的给药方式。近期研究表明, 转铁蛋白 (transferrin, Tf) 能够介导蛋白多肽药物在肠道上皮细胞转运, 促进药物吸收, 提高其生物利用度, 本文对此作一综述。

Tf 的相对分子质量约 75 ku ~ 77 ku, 是由肝脏

合成的一种单链糖蛋白, 含糖量约 6%, 含 4 个带负电荷的唾液酸基团, 生物半衰期为 8 d, 是血浆中主要的含铁蛋白质, 直接参与体内铁代谢, 承担对铁的吸收、贮存和利用部位之间的转运。Tf 可以与三价铁结合, 形成稳定的 Fe-Tf 复合物, 后随血液循环将铁转运到正常生长发育需铁的组织细胞。转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) 在人体内广泛表达: 原始红细胞的表达最高, 达 80%; 肠道上皮细胞、脑细胞、脑毛细血管内皮细胞、增殖细胞 (如肿瘤细胞、活化淋巴细胞、血清诱导的成纤维细胞) 中也有大量表达。

Tf 可以部分对抗胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的降解作用, 在胃肠道中稳定性较好。另外, Tf 自身的分子量相对较大, 体积小的药物分子能够以其作为载体来躲避外界环境中酶的破坏。Tf 介导的内吞作用是生物细胞最具特点的转运过程之一。如果将药物分子与 Tf 连接起来, 在 Tf 的介导下, 药物-Tf 结合物与 TfR 结合, 则可以被 TfR 高度表达的肠道

收稿日期: 2007-10-19

作者简介: 谢向阳, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型与新技术, Tel: 010-66932654, E-mail: xxy5727035@163.com

* 通讯作者: 梅兴国, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药剂学, Tel: 010-66932644, E-mail: xg-mei@yahoo.com

上皮细胞吸收。

1 药物-转铁蛋白结合物

研究人员最先采用化学合成的方法将 Tf 分别与胰岛素^[1]和粒细胞集落刺激因子^[2](G-CSF)连接起来,构成相应的药物-Tf 结合物,体内实验证明二者口服给药都具可观的药效。但是这种化学合成的结合物的分子大小和组成都不一致,难以达到药用标准。

Bai 等^[3]采用了基因重组的方法,将人 G-CSF 和 Tf 的 cDNA 重组在一起,两者间通过引入一个二肽联结物相连接。将重组基因转染 HEK293 细胞后,筛选出高度表达融合蛋白 G-CSF-Tf 的细胞株进行克隆。采用 MTT 法检测融合蛋白对 NFS-60 细胞增殖反应的影响,融合蛋白的 G-CSF 活性大约是原 G-CSF 的 1/10;将融合蛋白用¹²⁵I 标记后,以 Caco-2 细胞为模型,测得融合蛋白与 Caco-2 细胞亲和力是原 Tf 的 1/6。以上说明融合蛋白仍具有一定的生物活性和细胞亲和力。小鼠皮下注射相同剂量(摩尔量)的 G-CSF-Tf 和 G-CSF,两者的体内中性粒细胞绝对计数显示出相似的药效-时间曲线,最大药效时间出现在给药后 1 d。相同剂量的 G-CSF-Tf(50 mg·kg⁻¹)和 G-CSF 给予小鼠灌胃,G-CSF 组没有显示出药效,而 G-CSF-Tf 组显示出较强的药效。另外,从药效-时间曲线来看,G-CSF-Tf 口服给药后,药效可以持续 3 d,其皮下给药却只有 1 d;口服给药最大药效时间出现在给药后 2.5 d。上述体内实验说明,G-CSF-Tf 口服给药有效,虽起效迟缓但药效持久。此外,为了说明融合蛋白的吸收是由 Tf 介导的,将 G-CSF-Tf 分别与过量的血清白蛋白和 Tf 混合灌胃,血清白蛋白组仍然有效,Tf 组由于过量的 Tf 与 G-CSF-Tf 竞争 TfR 而没有药效。

近来,Bai 等^[4]采用空间优化的手段对 G-CSF-Tf 融合蛋白间的连接结构进行空间改造,筛选出了以 A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A 为序列的连接结构,其体内有效剂量为 20 mg·kg⁻¹,是二肽结构的一半。

2 转铁蛋白载体的修饰

由于 Tf 的 3.5 倍寡聚物可以延长其在肿瘤细胞中的停留时间,Lim 等^[5]据此认为制备 Tf 的寡聚物载体有可能增加药物在肠道的吸收。首先在 Tf 分子上引入巯基,然后通过氧化反应将巯基化的分

子连接起来,最终获得的寡聚物的平均相对分子质量为 280 ku,相当于 3.5 个 Tf 分子。Caco-2 细胞表面亲和力试验表明,与单分子 Tf 相比,寡聚物与细胞表面亲和力略有下降;将寡聚物用¹²⁵I 标记后,通过 Caco-2 细胞的行为脉冲追踪(performing pulse chase)实验研究寡聚物的胞内停留行为,结果显示寡聚物细胞内停留时间是 Tf 原型的 2 倍,但其跨胞转运能力没有显著变化。分别以寡聚物和 Tf 给予小鼠灌胃,24,48,72 h 时寡聚物血药浓度分别是 Tf 的 2,3,60 倍;另外,肠道内寡聚物的残留也比 Tf 要高。上述结果说明寡聚物作为载体比单体的 Tf 效果好。

在以上实验基础上,将 Tf 和寡聚物分别连接胰岛素分子,以相同剂量(摩尔量)给链佐星诱导的糖尿病大鼠灌胃,测定各时间点的血糖浓度。结果表明,两者所携带的胰岛素起效有一个约 8 h 的滞后期;在给药 9 h 后,寡聚物载体的降血糖效果显著强于 Tf 载体。以上表明,Tf 载体在适当修饰后可以提高胰岛素在肠道的递送效率。

3 转铁蛋白的缓释机制

由前文可知,Tf 在口服给药后,具有药理作用滞后且持续时间长的特点,Lim 等^[6]对此进行了深入的研究。

为了明确 Tf 结合物是否主要在肠道上皮细胞中吸收、积蓄,他们首先将¹²⁵I-Tf 分别与人结肠癌细胞 Caco-2,人乳腺癌细胞 MCF-7,人膀胱癌细胞 5637 孵育,定点测定细胞内的放射性强度。结果显示,只有 Caco-2 细胞对¹²⁵I-Tf 的摄取是随时间呈线性增长,而 MCF-7 和 5637 的摄取在孵育 1 h 后即达到饱和。另外,脉冲追踪试验也显示 Tf 在 Caco-2 细胞,而不是 MCF-7 中积蓄。此外,实验中发现 Tf 从 Caco-2 细胞的顶膜摄入比从底膜摄入时蓄积时间要长。由于没有文献报道 Tf 在其他细胞中有滞留,故可以认为口服 Tf 的缓释作用主要是由其在肠道上皮细胞中的滞留、蓄积所引起的。

研究者进一步探讨了 Tf 从 Caco-2 细胞顶膜和底膜摄取后蓄积时间差异的来源。先用异硫氰酸荧光素标记的 Tf 液分别冲洗 Caco-2 细胞融合膜的顶部和底部 0.5 h,再用磷酸盐缓冲液洗净细胞表面,然后 Rab11 等荧光抗体免疫标记细胞内部各个结构,激光共聚焦扫描显微镜下观察。结果显示从细胞顶部吞入的 Tf 有相当部分与 Rab11 阳性小室共

聚在一起,而底部摄入的却没有观测到此现象。由于 Rab11 参与非极化细胞的 Tf 摄取慢循环途径,且其显性与非显性突变体都能阻断中国仓鼠卵巢细胞(CHO)核周边内含体的 Tf 再循环途径。因此,可以推测 Tf 转运到 Rab11 阳性小室可以增加其在细胞中的蓄积,进而增强 Tf 从细胞顶膜至细胞底膜的跨细胞转运。

4 与水凝胶技术结合

Kavimandan 等^[7]将自行设计的一种功能型水凝胶材料用于 Tf-胰岛素结合物^[8]的口服给药,并进行了初步的体外评价。这种水凝胶属于 pH 敏感型水凝胶,在胃中不溶,故可在肠道中溶胀并释放其中携带的药物,由此可以减少药物在胃酸中的破坏;另外,该水凝胶可以粘附在胃肠道黏膜上,延长药物在胃肠道的停留时间。实验具体过程及结果如下。

首先将甲基丙烯酸(MAA)和甲氧基封端的聚乙二醇-单甲基丙烯酸(PEGMA)以摩尔比 1:1 混溶 in 乙醇溶液中,加入交联剂、光引发剂,经紫外线照射后形成聚合物,然后真空干燥,研磨过筛即得水凝胶颗粒。将 Tf-胰岛素结合物溶于 pH 7 的磷酸盐缓冲液中,加入水凝胶颗粒静置 12 h,然后加入适量的盐酸使药物固定在水凝胶颗粒中,冷冻干燥得到载药微粒,载药量约为 60%。体外释放试验表明载药颗粒在 pH 3.2 时基本不释放药物,pH 7.4 时 1 h 内释放总药量的 40%,此后释放增加缓慢。Caco-2 细胞体外吸收模型显示,Tf-胰岛素结合物的表观通透系数是单纯胰岛素的 16 倍,而含结合物的水凝胶制剂的表观通透系数是单纯胰岛素的 23 倍。上述结果表明,将 Tf 载体技术与水凝胶技术相结合,可能增加胰岛素在肠道中的吸收。

5 结语

Tf 介导的蛋白肽类药物口服给药虽已取得较

大的进展,但尚有许多问题有待深入研究,如 Tf 结合物的长期毒性评价,个体间吸收的变异性,结合物制剂的稳定性以及生产放大等。

今后,对以 Tf 为载体的蛋白多肽口服给药研究将会更多的与其他药物递送技术相结合^[9],如以功能型高分子材料作为药物释放载体,应用酶抑制剂和吸收促进剂,采用微粒载药体系和定位释药系统等等。Tf 作为一种新的药物载体,在蛋白多肽药物的口服给药领域将有着广阔应用前景。

参 考 文 献

- [1] Xia CQ, Wang J, Shen WC. Hypoglycemic effect of insulin-transferrin conjugate in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 295(2):594-600.
- [2] Widera A, Bai Y, Shen WC. The transepithelial transport of a G-CSF-transferrin conjugate in Caco-2 cells and its myelopoietic effect in BDF1 mice [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(2):278-284.
- [3] Bai Y, Ann DK, Shen WC. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(20):7292-7296.
- [4] Bai Y, Shen WC. Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(9):2116-2121.
- [5] Lim CJ, Shen WC. Comparison of monomeric and oligomeric transferrin as potential carrier in oral delivery of protein drugs [J]. *J Control Release*, 2005, 106(3):273-286.
- [6] Lim CJ, Norouziyan F, Shen WC. Accumulation of transferrin in Caco-2 cells: a possible mechanism of intestinal transferrin absorption [J]. *J Control Release*, 2007, 122(3):393-398.
- [7] Kavimandan NJ, Losi E, Peppas NA. Novel delivery system based on complexation hydrogels as delivery vehicles for insulin-transferrin conjugates [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(20):3846-3854.
- [8] Kavimandan NJ, Losi E, Wilson JJ, et al. Synthesis and characterization of insulin-transferrin conjugates [J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17(6):1376-1384.
- [9] Morishita M, Peppas NA. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? [J]. *Drug Discov Today*, 2006, 11(19/20):905-910.

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎登陆我刊网站