

蛋白类药物口服药剂的设计与稳定性研究

张 涵,原续波*

(天津大学材料科学与工程学院,天津 300350)

摘要:口服给药具有方便、安全、患者依存性强等优势,是理想的给药途径,但蛋白类药物在口服过程中易被胃酸及蛋白酶分解而失活,导致生物利用度较低。本实验设计了一种药物载体,用于蛋白类药物口服给药,解决了蛋白类药物在胃肠道中易失活的问题。以葡萄糖氧化酶为蛋白药物模型,通过在蛋白质表面原位自由基聚合反应制备葡萄糖氧化酶纳米微囊,低温干燥后研磨成粉末封装在胶囊中。以羟丙甲纤维素为原料,通过酯化反应制备醋酸羟丙甲纤维素琥珀酸酯,将其作为肠溶包衣材料对以上胶囊进行包衣,得到肠溶胶囊。通过模拟胃肠道内的环境,对肠溶胶囊进行体外释放实验及蛋白活性测试。结果显示,在胃液环境下,该肠溶胶囊2h内不溶解,且胶囊内的葡萄糖氧化酶保持较高活性;在肠液环境下,肠溶胶囊溶解,被纳米微囊包载的葡萄糖氧化酶活性明显高于游离态葡萄糖氧化酶。以上实验结果证明了该载药体系可以解决口服蛋白类药物在胃肠道中易被胃酸及蛋白酶分解而失活的问题。

关键词:蛋白类药物;口服给药;纳米微囊;醋酸羟丙甲纤维素琥珀酸酯;蛋白活性

随着生物医药的发展,越来越多具有药理活性的蛋白质及多肽分子被发现,如胰岛素^[1]、单克隆抗体^[2]、疫苗^[3]等,在激素调节^[1]、抗肿瘤^[4]、抗病毒^[5]等治疗领域发挥着重要作用,成为现代医药的重要组成部分。目前,临床应用过程中蛋白类药物以注射给药途径为主。由于长期注射存在易过敏、易感染,患者依存性差等问题^[6],因此对蛋白类药物非注射给药途径的研究意义重大。口服给药方式具有方便、安全、无痛、患者依存性强、吸收面积大等优势,是理想的给药方式^[7]。但蛋白类药物口服给药方式面临诸多问题,例如,胰岛素或尼妥珠单抗等蛋白质类药物在小肠内可以通过细胞旁路或跨细胞转运途径被小肠吸收,进入血液经肝脏循环到全身^[8,9],但是口服过程中胃肠道内丰富的蛋白酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶)以及胃中低pH环境会导致蛋白质失活^[10,11],这使得药物生物利用度较低。因此,本研究拟制备一种蛋白质口服载体解决蛋白类药物在胃肠道中易失活的问题。

为解决蛋白类药物口服过程中被蛋白酶水解的问题,通常的方法有直接对蛋白质进行结构修饰增强药物的抗酶解性^[12];使用蛋白酶抑制剂抑制胃肠道中蛋白酶活性^[13];借助纳米粒子载体保护蛋白类药物^[14]。其中,修饰后的蛋白质活性通常降低^[15],长期使用酶抑制剂会造成不可逆的黏膜损伤和胃肠道消化紊乱^[16],而纳米粒子载体因其尺寸小、易吸收、体内稳定性好等优点,成为蛋白质口服载体研究的重要方向^[17~19]。Lowe等利用异氰酸酐基丙烯酸异丁酯(BCA)在水中易在辛酸癸酸甘油三酯表面发生聚合反应的原理,制备聚合物纳米粒子包载降钙素,利用三氯乙酸(TCA)沉淀法,证明了与游离态降钙素相比,包载后的降钙素在肠液中的酶解速度明显下降^[20]。Han等用甜菜碱(PCB)与1,2-二硬脂酰-SN-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)偶联反应后封装胰岛素得到两性离子胶束,研究发现制备的胶束在肠液中结构保持稳定,且胰岛素保持较高活性,并成功克服了小肠黏液和上皮细胞等生理屏障,提高了口服胰岛素的生物利用度^[21]。虽然有上述研究,但目前对于蛋白类药物口服给药纳米载体的研究仍十分有限。Han等以2-甲基丙烯酸氧基乙基磷酸胆碱(MPC)为单体,制备纳米微囊包裹尼妥珠单抗,提升其在体内的稳定性。在实验过程中发现,在37℃下,与胰蛋白酶孵育120min后,纳米微囊包载的单克隆抗体活性仍具备80%的活性,而未包载的单克隆抗体活性几乎完全消失,这说明纳米微囊提高了单克隆抗体的

10.14028/j.cnki.1003-3726.2022.05.008

收稿:2020-10-11;修回:2021-08-22;

作者简介:张涵(1994-),男,硕士研究生,目前研究领域为生物高分子材料;

* 通讯联系人:原续波,教授,主要从事生物医用材料研究。E-mail:xyuan@tju.edu.cn.

抗酶解能力^[22],但实验所用的单体 MPC 所形成的聚合物因为磷酸胆碱的存在,对细胞内吞有抑制作用,不利于蛋白质在小肠中的吸收^[23]。Liu 等以丙烯酰胺(AAM)、*N*-(3-氨基丙基)甲基丙烯酸盐(APM)为单体,二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)为交联剂包载 miRNA,得到的纳米微囊可以通过细胞内吞进入细胞内部并降解,但并未研究纳米微囊能否提高蛋白质的抗酶解性^[24]。受上述研究启发,以丙烯酰胺作为单体制备纳米微囊包载蛋白质,有望解决蛋白类药物在胃肠道内被蛋白酶水解的问题。

针对蛋白类药物在胃液低 pH 环境下易失活的问题,常用的方法是利用肠溶包衣材料对药物包衣。肠溶包衣材料是一种在胃液环境中不溶,小肠液环境中迅速溶解的包衣材料,其形成的包衣膜可以使易水解或易酶解的活性药物在酸性强、酶丰富的胃液中保持完好无损,并在小肠液中迅速释放^[25~27]。其特殊机制在于不同 pH 环境中肠溶包衣材料溶解性不同,即在低 pH 环境中(pH=1~3)聚合物溶解度低,防止药物溶出,在较高 pH 环境中(pH=4~7)聚合物溶解并释放药物^[28]。醋酸羟丙甲纤维素琥珀酸酯(HPMCAS)是以羟丙甲纤维素(HPMC)为原料,与醋酸酐、丁二酸酐酯化而得,具备良好的 pH 敏感性(pH 为 4.5~6.5 的溶液中溶解)、成膜性和无毒性,是一种理想的肠溶包衣材料^[29]。因此,本文以 HPMCAS 作为肠溶包衣材料制备肠溶胶囊,提高蛋白质类药物口服载体的耐酸能力,解决蛋白类药物在胃液低 pH 环境下易失活的问题。

本实验拟设计一种药物载体用于蛋白质药物口服给药,解决蛋白质药物在胃肠道中易失活的问题,提高其生物利用度。首先,以葡萄糖氧化酶(GOD)为模型蛋白,AAM、APM 为单体,EGDMA 为交联剂(如图 1 所示),单体和交联剂通过静电力和氢键的相互作用围绕在蛋白质分子周围(步骤 I),在引发剂的作用下,在蛋白质表面发生原位自由基聚合形成聚合物网络(步骤 II),制备纳米微囊,低温干燥后,研磨成粉末放入胶囊中(步骤 III)。然后以 HPMC 为原料,合成 HPMCAS,以 HPMCAS 为包衣材料对以上胶囊进行包衣制得肠溶胶囊(步骤 IV)。该肠溶胶囊在胃道中将保持不溶(步骤 V),保护内部纳米微囊通过胃液,在肠液中溶解,释放出纳米微囊(步骤 VI),纳米微囊在肠液中保持结构稳定,葡萄糖氧化酶仍具备较高活性。该药物载体能够同时解决口服蛋白类药物在胃肠道中易被胃酸和蛋白酶分解的问题。

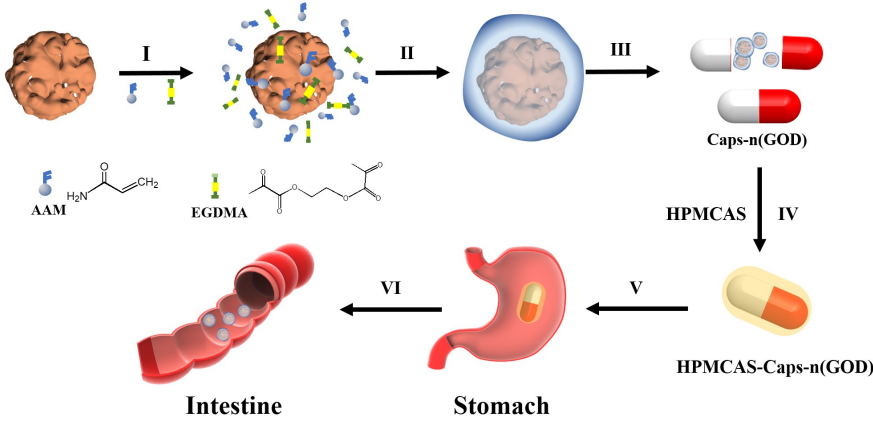


图 1 蛋白质口服载药体系的制备及在胃肠道内的模拟示意图

Figure 1 Schematic illustration of preparation of protein oral drug delivery system and simulation in the gastrointestinal tract

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase,酶活性为 340UI/mg)、*N*-(3-氨基丙基)甲基丙烯酸盐(*N*-(3-Aminopropyl) methacrylamide hydrochloride)、二甲基丙烯酸乙二醇酯(Ethyleneglycol

dimethacrylate)、辣根过氧化氢酶(Horseradish peroxidase,酶活性为 ≥ 200 UI/mg),购自天津希恩思生化科技有限公司;丙烯酰胺(Acrylamide)、 β -D 葡萄糖(β -D-Glucose),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;过硫酸铵(Ammonium persulphate)、四甲基乙二胺(N,N,N',N' -Tetramethylethylenediamine),购自 Sigma 试剂公司;羟丙甲纤维素(Hydroxypropyl methylcellulose),购自湖州展望药业有限公司;丁二酸酐(Succinic anhydride),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙酸酐(Acetic anhydride)、冰乙酸(Acetic acid)、无水乙酸钠,购自天津市元立化工有限公司。未特殊说明的药品与试剂均为分析纯级别,按照药品说明使用。

超低温冷冻干燥机(SCIENTZ-12N 型,中国宁波新芝生物科技有限公司);液体核磁共振仪(400MHz 型,德国布鲁克科技有限公司);傅里叶变换红外光谱(IS10 型,中国赛默飞世尔科技有限公司);纳米粒度及 Zeta 电位仪(Nano ZS 型,英国马尔文仪器有限公司);紫外可见分光光度计(A360 型,中国上海翱艺仪器有限公司);多功能酶标仪(ELx800,美国博腾仪器有限公司);共聚焦显微镜(FV1200,A1R+,日本尼康仪器有限公司)。

1.2 肠溶胶囊的合成及表征

1.2.1 葡萄糖氧化酶纳米微囊的制备 将 10mg GOD 溶于 1mL 蒸馏水,配置 GOD 溶液。按表 1 中的比例向溶液中依次加入单体 APM、AAM 和生物可降解交联剂 EGDMA,搅拌后加入引发剂过硫酸铵(APS)和催化剂四甲基乙二胺(TEMED),在 4℃ 条件下避光反应 2h。反应结束后在 20mmol/L 的磷酸缓冲液中透析 24h,即获得葡萄糖氧化酶纳米微囊(n(GOD))。

表 1 制备纳米微囊各成分的原料比						
Table 1 The material ratio of each component in the preparation of nanocapsules						
试剂	GOD	APM	AAM	EGDMA	APS	TEMED
摩尔比	1	500	5500	100	600	600

1.2.2 肠溶包衣材料 HPMCAS 的制备 在三口烧瓶中依次加入 10g HPMC 和 50mL 冰乙酸,70℃ 下搅拌 1h 左右完全溶解。加入适量乙酸酐、丁二酸酐和无水乙酸钠,升温至 85℃ 反应 3h。反应结束后用 15mL 去离子水和 2mL 浓盐酸终止反应。将反应物倾入过量的去离子水中并搅拌,得到白色絮状物。过滤后用去离子水洗涤至 pH 值大于 5.0,干燥后研磨成粉末得到 HPMCAS 粉末。

1.2.3 肠溶胶囊的制备 将纳米微囊置于冻干机中 24h,干燥后研磨成粉末,封装在胶囊内;取 0.5g HPMCAS 粉末溶于 10mL 乙醇/二氯甲烷混合溶剂(体积比 1 : 1),配成 5% 包衣液,对胶囊进行包衣,即得肠溶胶囊,记为 HPMCAS-Caps-n(GOD),将未包衣的胶囊记为 Caps-n(GOD)。

1.3 葡萄糖氧化酶纳米微囊的表征

用移液枪取 150 μ L 透析后的 GOD 及 n(GOD)加入微量皿中,采用激光粒度仪对纳米微囊的粒径进行测试;用移液枪分别取 500 μ L 透析后的 GOD 和 n(GOD)加入样品池中,插入电极,采用激光粒度仪对纳米微囊的电位进行测试;用三羟甲基氨基甲烷、乙酸和乙二胺四乙酸组成的缓冲液(TAE 缓冲液)配制得到 0.7% 的琼脂糖,加热煮沸至澄清透明,稍待冷却后,移入电泳槽内至琼脂糖凝胶凝固,分别取 GOD 和 n(GOD)样品 20 μ L 与 4 μ L 甘油混合均匀后加入凝胶孔中,在电压为 120V、电位为 400mA 的条件下电泳 15min,根据紫外分析仪激发波长在观察纳米微囊所处的条带位置。

1.4 HPMCAS 结构表征

采用傅里叶红外光谱仪的透射模式对 HPMCAS 粉末样品进行测试,取适量粉末样品与溴化钾(KBr)以 1 : 100 的质量比例混合后压片进行红外分析,扫描波数为 4000~350cm⁻¹,扫描 32 次。将 HPMCAS 粉末样品干燥后溶于氘代二甲基亚砷(DMSO-d₆),采用核磁共振波谱仪在室温下测定样品的核磁共振氢谱图。

1.5 肠溶胶囊在胃液中的溶解及蛋白活性测试

为了验证肠溶胶囊的耐酸性,取适量纳米微囊粉末分别封装于肠溶胶囊和未包衣胶囊内,将肠溶胶囊和未包衣胶囊分别置于人工胃液中^[30],2h 后观察胶囊的溶解情况。

2h 后取出胶囊,溶于磷酸缓冲液。利用辣根过氧化物酶法测试蛋白质活性^[31],实验步骤如下:取适量邻联茴香胺甲醇溶液、葡萄糖液、辣根过氧化氢酶溶液、混匀,30℃ 下放置 5min,加入葡萄糖氧化酶溶液 0.1mL。在波长 460nm 处立即读数,3min 后再次读数,两次吸光度差记作 ΔA ,将游离态葡萄糖氧化酶在磷酸缓冲液中(pH=7)的活性 X_0 记为 100%,根据公式(1)计算葡萄糖氧化酶相对活性并进行比较。

$$\text{Enzyme activity}(\%) = \frac{X_{\text{sample}}}{X_0} \times 100\% = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中, X_{sample} 代表实验组 GOD 或 n(GOD)活性; X_0 代表游离态葡萄糖氧化酶溶于磷酸缓冲液中的活性; ΔA_{sample} 代表实验组 GOD 或 n(GOD)反应前后吸光度的差值; ΔA_0 代表游离态葡萄糖氧化酶溶于磷酸缓冲液中反应前后吸光度的差值。

1.6 肠溶胶囊在肠液中的释放及蛋白活性测试

为了探究肠溶胶囊能否在肠液内释放。取适量 FITC 荧光标记的纳米微囊粉末封装于肠溶胶囊中,置于人工肠液(pH=6.8)中^[32],观察肠溶胶囊的溶解情况,并每隔一段时间取 100 μ L 溶液置于 96 孔板中,并补充介质溶液保证溶液总体积不变,在 485~518nm 处用酶标仪测定荧光强度,通过计算得到累计释放率。

为了测试纳米微囊在肠液中的结构稳定性,取适量纳米微囊封装于肠溶胶囊中,置于人工肠液(pH=6.8),待纳米微囊溶解后,在 0~16h 之间每隔 2h 取 150 μ L 溶液加入微量皿中,采用激光粒度仪对纳米微囊的粒径进行测试。

为测试纳米微囊对葡萄糖氧化酶在肠液中的活性影响,取适量 n(GOD)粉末溶于含有胰蛋白酶的人工肠液中,作为实验组溶液,相同质量的 GOD 溶于含胰蛋白酶的人工肠液中,作为对照组溶液。在 0、4、8、12、16h 时利用 1.5 节的方法测试蛋白活性并进行比较。

1.7 细胞毒及细胞内吞测试

蛋白质纳米微囊通过胃肠道酶和酸的生理屏障之后,将被小肠上皮细胞摄取,从而参与体内循环。在肠道摄取过程中,纳米微囊是否影响到肠上皮细胞的正常生长,以及是否能被上皮细胞吸收,是评价纳米微囊作为蛋白质类药物口服给药载体的重要内容。

采用 CCK-8 法进行细胞毒性实验,选取人结直肠腺癌细胞(Caco-2 细胞)来模拟人体小肠上皮细胞^[33],进行细胞毒性及细胞摄取实验,将 Caco-2 细胞接种于 96 孔板中,分为空白孔、 1.5×10^{-5} 、 3.0×10^{-5} 、 1.5×10^{-4} 、 3.0×10^{-4} 、 1.5×10^{-3} mol/L 的纳米微囊共 6 组,每组各 6 个孔,每孔约 5×10^3 个细胞,加入 200 μ L 培养基。37℃,5% CO₂ 培养箱中过夜,分别换为含有不同纳米微囊浓度的培养基,继续培养 72h。吸去各孔内培养基,每孔中加入 100 μ L 浓度为 10% 的 CCK-8 增强型溶液,放入 CO₂ 培养箱孵育 1h,用多功能酶标仪检测每孔溶液在 450nm 处的吸光度,计算各组细胞的存活率。

为验证纳米微囊能否被小肠上皮细胞摄取,将 Caco-2 细胞接种于铺有细胞爬片的六孔板中,每孔约 10^5 个细胞。每孔加入 FITC 标记的纳米微囊,使其浓度为 1mg/mL,在 37℃ 下孵育 4h。孵育结束后除去培养基,用 PBS 缓冲液清洗除去细胞表面的纳米微囊。每孔加入用 10 μ g/mL DAPI 染核 5min。PBS 缓冲液清洗干净后,用防淬灭的封片剂封片。用荧光共聚焦显微镜观察。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖氧化酶纳米微囊的表征

纳米微囊制备过程中,单体 AAM 和 APM 吸附在 BSA 表面,在引发剂 APS 作用下发生自由基聚合反应,通过 EGDMA 的交联作用在 BSA 表面形成网状壳层。体系中 EGDMA 不溶于 PB 缓冲液,为避免

体系发生聚沉,反应过程中应充分涡旋振荡使体系分散,并在 4℃ 搅拌条件下进行,使 AAM、APM 及 EGDMA 等能够均匀地分布在 BSA 周围,以得到尺寸均一的纳米微囊。

图 2(a)是 GOD 及被纳米微囊包载后经纳米粒度及 Zeta 电位仪测试得到的粒径。溶解在磷酸缓冲液中的 GOD 粒径在 6~20nm 范围内,经过纳米微囊成功包载后粒径可增至 10~70nm 之间。图 2(b)是 GOD 及 n(GOD)经纳米粒度及 Zeta 电位仪测试得到的电位,GOD 在磷酸缓冲溶液中电位为负性,在经纳米胶囊的包埋后,其表面负电性被聚合物壳层所包埋屏蔽,体系呈中性电位并具有微正电性,这主要是由于 APM 单体上的 NH₂ 在磷酸缓冲液中质子化形成阳性粒子,使得微囊表面显示微弱的正电性。

图 2(c)是 GOD 及被纳米微囊包载后琼脂糖凝胶电泳测试结果。GOD 在 TAE 缓冲液中表面呈负电性,加入琼脂糖凝胶进行电泳时会离开加样孔并向正极移动,GOD 在经纳米微囊包载后,其表面负电性被聚合物壳层所包埋屏蔽,同时 APM 正电性单体的加入会中和一部分负电荷,使得整体的负电性减弱,加入琼脂糖凝胶进行电泳时会滞留在孔中,并且少部分样品向负极移动。结合电位测试、粒度测试及琼脂糖凝胶电泳的结果,证明 GOD 被成功包载在纳米微囊内部。

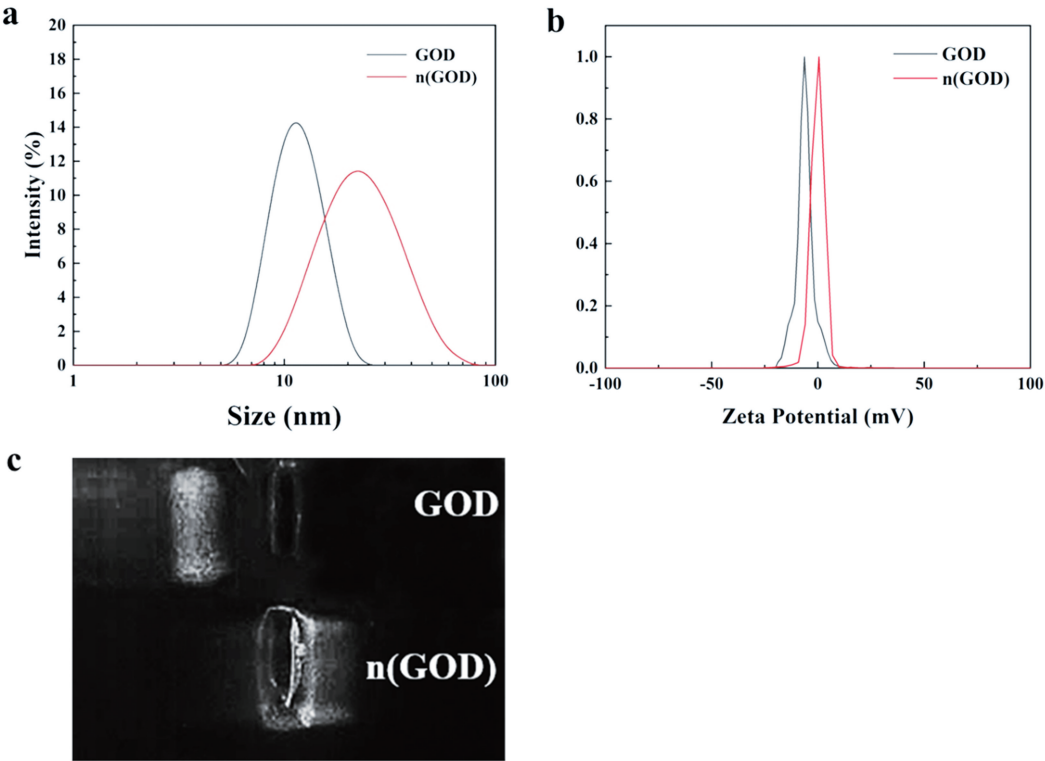


图 2 a. 葡萄糖氧化酶及纳米微囊粒度分布;b. 葡萄糖氧化酶及纳米微囊电位;c. 葡萄糖氧化酶及纳米微囊琼脂糖凝胶电泳
Figure 2 a. The size distribution of GOD and n(GOD); b. The potential distribution of GOD and n(GOD);
c. The agarose gel electrophoresis of GOD and n(GOD)

2.2 HPMCAS 的结构表征

HPMC 的分子链上有大量活性端羟基,通过乙酸酐和丁二酸酐对其酯化得到 HPMCAS,酯化反应式如图 3(a)所示。图 3(b)是 HPMC 与 HPMCAS 颗粒在 4000~400cm⁻¹ 波数范围内的红外光谱图,通过对比两者的红外曲线可以看出,HPMCAS 在 1739cm⁻¹ 处出现了很强的吸收峰,归属于酯基和羧基的羰基(C=O)伸缩振动峰;1057cm⁻¹ 处的吸收峰归属于酯基和羧基的 C—O 伸缩振动峰,这两处峰说明 HPMCAS 中存在酯基。此外,HPMCAS 颗粒的其余吸收峰与 HPMC 类似,未发生明显的位置或强度变化,说明该反应未改变 HPMC 的其它化学基团。

图 3(c)为 HPMC 与 HPMCAS 颗粒的核磁共振氢谱图。2.5ppm 处为 DMSO-d₆ 的溶剂峰,a 处羟

丙氧基上的甲基氢的峰,b 处为羟丙氧基酯化后的甲基氢的峰,HPMCAS 颗粒在 a 处的峰强略有降低且在 b 处出现新峰,说明 HPMC 的羟丙氧基与酸酐发生了酯化反应;c 处为丁二酰基的亚甲基和乙酰基的甲基氢的峰;d 处为甲氧基上甲基氢的峰和水峰;e 处为亚甲基氢的峰;f 为羧基氢的峰,由于羧基氢属于活泼氢,本文选择了能与醇羟基形成稳定氢键的 DMSO-d₆ 作为溶剂并且测试前已将样品干燥,因此可以观察到此峰的存在,说明了 HPMCAS 含有可降解的端羧基。综上所述,通过结合红外光谱与核磁氢谱可以确定合成产物为目标产物 HPMCAS,并根据峰面积的比值求出丁二酰基的取代度为 6.8%,乙酰基取代度为 13.6%。

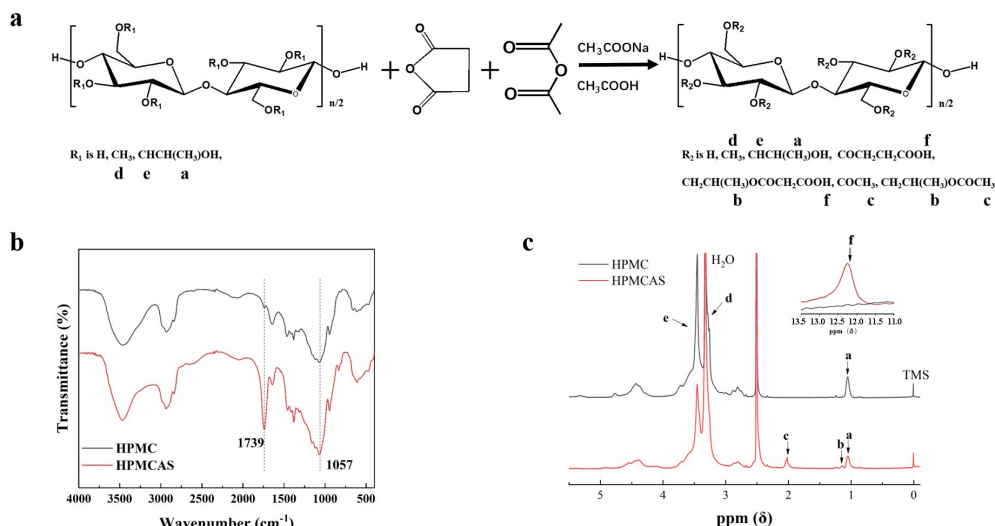


图 3 a. HPMCAS 的合成反应式及其化学结构;b. HPMC 与 HPMCAS 颗粒的红外光谱图;
c. HPMC 与 HPMCAS 颗粒的核磁氢谱图

Figure 3 a. The reaction scheme and chem structure of HPMCAS; b. The FTIR spectra of HPMC and HPMCAS particles; c. The ¹H-NMR spectra of HPMC and HPMCAS particles

2.3 肠溶胶囊在胃液中溶解情况及蛋白活性测试

中国药典规定肠溶包衣膜在胃液中 2h 内不溶解,即可达到标准。图 4(a)为未包衣的胶囊在胃液中的溶解照片,可以观察到,放置胃液 2h 后,胶囊已经溶解。图 4(b)为肠溶胶囊刚刚放入胃液中与放入 2h 后的照片。放置胃液 2h 后,肠溶胶囊未溶解,符合中国药典所规定的标准,在胃液中可以起到保护蛋白质的作用。

对葡萄糖氧化酶在胃酸中的活性进行检测,原理如下:葡萄糖氧化酶分解 β-D 葡萄糖生成过氧化氢,过氧化氢在辣根过氧化物酶作用下使邻联茴香胺发生变色反应,紫外-可见光吸收光在 460nm 处吸光度会增加。葡萄糖氧化酶活性越高,吸光度增加量越大,且活性与吸光度增加量成正相关。将 GOD、n(GOD)、Caps-n(GOD)及 HPMCAS-Caps-n(GOD)分别置于人工胃液中,在 0h 和 2h 利用辣根过氧化物酶法分别测定蛋白活性进行对比。如图 4(c)所示,GOD、n(GOD)和 Caps-n(GOD)内的 GOD 溶于胃液 2h 后完全失活,说明蛋白质在胃液中及易失活,同时说明在胃液中纳米微囊和普通胶囊对蛋白质并无保护作用。而封装在肠溶胶囊中的 GOD 在胃液中受影响较小,仍具备较大活性,这说明肠溶包衣可以有效避免胃酸对蛋白类药物的破坏作用,从而保护蛋白类药物顺利通过胃部。

2.4 肠溶胶囊在肠液中的释放及蛋白活性测试

中国药典规定,肠溶包衣材料在肠液中需要在 1h 内溶解。如图 5(a)所示,20min 时,肠溶胶囊已完全溶解,符合中国药典对肠溶包衣材料的标准。胶囊溶解后,纳米微囊开始溶解,如图 5(b)所示,2h 内的蛋白质药物累计释放率可达 61.7%,具备快速释放能力,在 6h 释放率可达 85%以上,且最终释放率

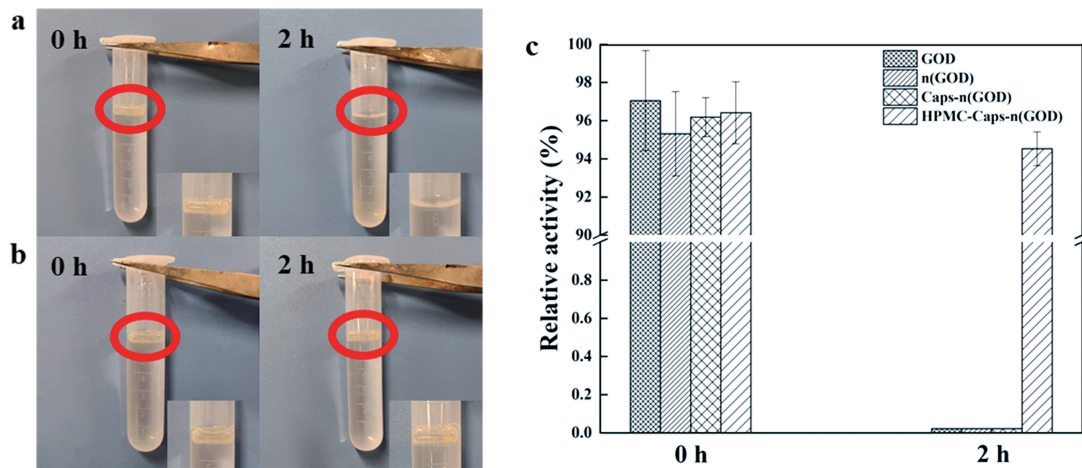


图 4 a. 未包衣胶囊在胃液中的溶解情况;b. 肠溶胶囊在胃液中的溶解情况;
c. GOD、n(GOD)、Caps-n(GOD)及 HPMCAS-Caps-n(GOD)在胃液中的活性

Figure 4 a. Dissolution of uncoated capsules in gastric juice; b. Dissolution of enteric-coated capsules in gastric juice;
c. Activity of GOD, n(GOD), Caps-n(GOD) and HPMCAS-Caps-n(GOD) in gastric juice

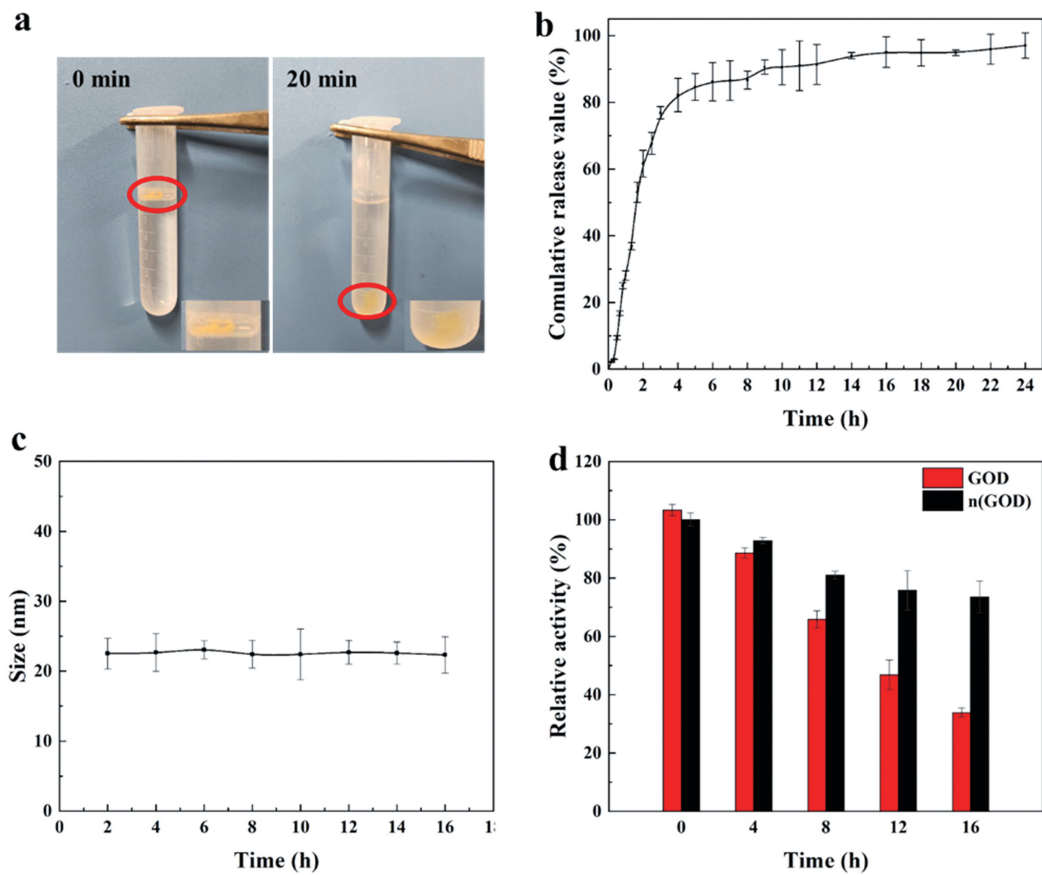


图 5 a. 肠溶胶囊在肠液中的溶解情况;b. 肠溶胶囊在肠液中的释放曲线;
c. 纳米微囊在肠液中的粒径;d. 葡萄糖氧化酶及其纳米微囊在肠液中的活性

Figure 5 a. Dissolution of enteric-coated capsules in intestinal juice; b. Release curve of enteric-coated capsules in intestinal juice; c. Size of nanocapsules in intestinal juice; d. Activity of GOD and n(GOD) in intestinal juice

可达到 97%。

肠溶胶囊溶解后,包载蛋白质的纳米微囊 8h 基本溶于肠液,溶液在小肠处平均停留时间为 3~4h,最长可达到 8h^[34]。因此,纳米微囊结构需要在 16h 内保持稳定,才能有效保护蛋白类药物的活性。图 5(c)为纳米微囊在人工肠液中粒径的测试,纳米微囊溶于肠液 16h 内,其粒径基本保持不变,说明纳米微囊在肠液中 16h 内结构保持稳定。

如图 5(d)所示,游离态 GOD 在含有胰蛋白酶的人工肠液中活性下降的较快,12h 活性已下降至 50%以下,16h 后活性下降至 34%。而包载纳米微囊的 GOD 在 12h 仍具备 80%的活性,16h 具备 73%的活性。这说明纳米微囊包载后的蛋白质可以有效避免被胰蛋白酶水解,保持较高活性。这是因为纳米微囊表面致密的网状结构可以阻止大分子物质(如胰蛋白酶)进入纳米微囊内部,避免了蛋白酶与中心蛋白的接触,从而提高了蛋白质的抗酶解性。

2.5 细胞毒性及内吞实验

采用 Caco-2 细胞对纳米微囊细胞毒性进行研究,如图 6(a)所示,纳米微囊的浓度由 15nmol/L 增大到 1500nmol/L 时,细胞存活率仍达到 85%以上,说明合成的纳米微囊毒性较低。这是由于纳米微囊制备完成后,置于透析袋中透析 48h,将有机溶剂 DMSO、未反应的小分子以及低聚物透析除去,在体系中只剩下纳米微囊表面的高分子聚合物 PAAM。这说明,纳米微囊是一种生物相容性良好的药物载体,口服过程中对小肠上皮细胞损伤较低。

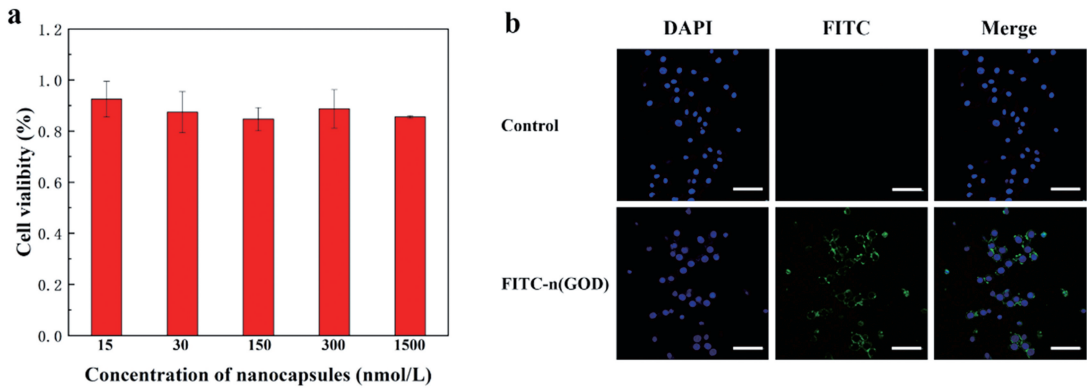


图 6 a. Caco-2 细胞与 n(GOD)培养 72h 后的细胞活性;b. Caco-2 细胞与标有 FITC 的纳米微囊孵育 4h 后的荧光共聚焦观察结果

Figure 6 a. Viability of Caco-2 cells at various concentrations of n(GOD) for 72h;

b. Fluorescence confocal observation of Caco-2 cells and FITC-labeled nanocapsules after incubation for 4h

图 6(b)是 Caco-2 细胞在含有 FITC 标记的纳米微囊的培养基中孵育 4h 的激光共聚焦图。从图中看到细胞核被 DAPI 染色后在激发光照射下,呈蓝色,FITC 在激光照射下呈绿色。与对照组相比,实验组细胞核周围有绿色荧光,说明纳米微囊可以被 Caco-2 细胞摄取。

3 结论

本实验设计了一种药物载体用于蛋白质药物口服给药,解决了蛋白质药物在胃肠道中易失活的问题。以 GOD 为蛋白药物模型,AAM 为单体,EGDMA 为交联剂,成功制备了 n(GOD)。以 HPMC 为原料,乙酸酐、丁二酸酐为酯化剂,制备了 HPMCAS。将冷冻干燥后的 n(GOD)粉末封装在胶囊中,用 HPMCAS 对该胶囊包衣,得到肠溶胶囊。肠溶胶囊在胃液中 2h 内不溶解,且葡萄糖氧化酶活性不受影响,达到了肠溶包衣材料的标准,解决了蛋白质在胃液中失活的问题。在肠液中,肠溶胶囊 20min 即可完全溶解,6h 后,n(GOD)已基本溶解在肠液中,且经纳米微囊包载后的 GOD 溶于肠液 16h 后,仍有 73%

活性,明显高于游离态葡萄糖氧化酶,解决了蛋白质在肠液中易被酶解的问题。用 Caco-2 细胞模拟人体小肠上皮细胞,验证了口服给药载体对上皮细胞细胞损害较低,且能被上皮细胞吸收,生物相容性良好。以上实验证明了该口服给药载体能够同时解决蛋白类药物在胃液低 pH 环境中易变性失活和在肠道内被胰蛋白酶水解失活的问题,有望推动蛋白类药物口服给药途径的发展。

参考文献:

[1] Zhang Y Q, Yu J C, Kahkoska A R, Wang J Q, Buse J B, Gu Z. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 139: 51~70.

[2] Marston H D, Paules C I, Fauci A S. *N Engl J Med*, 2018, 378(16): 1469~1472.

[3] Le T T, Andreadakis Z, Kumar A, Román R G, Tollefsen S, Saville M, Mayhew S. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(5): 305~306.

[4] Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Nicolantonio F D, Saletti P, Dosso S D, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 1851~1857.

[5] De C E, Li G. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29(3): 695~747.

[6] Tyagi P, Pechenov S, Subramony J A. *J Control Release*, 2018, 287: 167~176.

[7] Xu Y, Hul M V, Suriano F, Pr  at V, Cani P D, Beloqui A. *Gut*, 2020, 69(5): 911~919.

[8] Karasov W H. *J Exp Biol*, 2017, 220(14): 2495~2501.

[9] Yun Y, Cho Y W, Park K. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(6): 822~832.

[10] Muheem A, Shakeel F, Jahangir M A, Anwar M, Mallick N, Jain G K, Warsi M H, Ahmad F J. *Saudi Pharm J*, 2016, 24(4): 413~428.

[11] Boushra M, Tous S, Fetih G, Korzekwa K, Lebo D B, Xue H Y, Wong H L. *Int J Pharm*, 2016, 511(1): 462~472.

[12] Garattini S, Bertele V. *Bmj*, 2002, 325: 269~271.

[13] Liu C, Kou Y Q, Zhang X, Cheng H B, Chen X Z, Mao S R. *Expert Opin Drug Del*, 2018, 15(3): 223~233.

[14] Card J W, Magnuson B A. *Am J Physiol-Gastr L*, 2011, 301(6): 956~967.

[15] Hinds K D, Kim S W. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(4): 505~530.

[16] Kumar Malik D, Baboota S, Ahuja A. *Curr Drug Deliv*, 2007, 4(2): 141~151.

[17] Batista P, Castro P M, Madureira A R, Sarmiento B, Pintado M. *Peptides*, 2018, 101: 112~123.

[18] Lollo G, Gonzalez-Paredes A, Garcia-Fuentes M, Calvo P, Torres D, Alonso M J. *J Pharm Sci-Us*, 2017, 106(2): 611~618.

[19] Thwala L N, Delgado D P, Leone K, Marigo L, Benetti F, Chenlo M, Alvarez C V, Tovar S, Dieguez C, Csaba N S, Alonso M J. *J Control Release*, 2018, 291: 157~168.

[20] Lowe P J, Temple C S. *J Pharm Pharmacol*, 1994, 46(7): 547~552.

[21] Han X F, Lu Y, Xie J B, Zhang E S, Zhu H, Du H, Wang K, Song B Y, Yang C B, Shi Y J, Cao Z Q. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15: 605~614.

[22] Han L, Liu C Y, Qi H Z, Zhou J H, Wen J, Wu D, Xu D, Qing M, Ren J, Wang Q X, Long L X, Liu Y, Chen L, Yuan X B, Lu Y F, Kang C S. *Adv Mater*, 2019, 31(19): 1805697.

[23] Li S D, Chen L Y, Huang K, Chen N, Zhan Q, Yi K K, Qi H Z, Liu C Y, Tan Y L, Hou X, Lu Y F, Zhao J, Yuan X B, Kang C S. *Adv Funct Mater*, 2020, 29(43): 1903296.

[24] Liu C Y, Wen J, Meng Y B, Zhang K L, Zhu J L, Ren Y, Qian X M, Yuan X B, Lu Y F, Kang C S. *Adv Mater*, 2015, 27(2): 292~297.

[25] Bushra R, Shoaib M H, Aslam N, Mehmood Z A, Hashmat D. *Braz J Pharm Sci*, 2010, 46(1): 99~107.

[26] Ali S F, Afrooz H, Hampel R, Mohamed E M, Bhattacharya R, Cook P, Khan M A, Rahman Z. *Int J Pharmaceut*, 2019, 567: 118462.

[27] Zhou M M, Wang L, Zhang X L, Zhou H J, Chen X Q, Li Y T, Yang S L. *Mater Sci Eng C*, 2017, 170(1): 012021.

[28] Liu Y H, Zhu X, Zhou D, Jin Y, Zhao C Y, Zhang Z R. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 37(7): 868~874.

[29] 邵自强,郑一平,李永红,王文俊. *中国药学杂志*, 2005, 39(11): 846~848.

[30] Xiao Y F, Tang Z M, Wang J Q, Liu C, Kong N, Farokhzad O C, Tao W. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 2~11.

[31] 李丕武,刘瑜,李瑞瑞,段梦迪,黄少华. *食品工业科技*, 2013, 34(12): 71~75.

[32] Hamed R, Awadallah A, Sunoqrot S, Tarawneh O, Nazzal S, Baraghtli T A, Sayyad J A, Abbas A. *Aaps Pharmscitech*, 2016, 17(2): 418~426.

[33] Pontier C, Pachot J, Botham R, Lenfant B, Arnaud P. *J Pharm Sci*, 2001, 90(10): 1608~1619.

[34] Yuen K H. Int J Pharmaceut, 2010, 395(12): 9~16.

Design and Stability of Oral Protein Drugs

ZHANG Han, YUAN Xu-bo*

(School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Abstract: Oral administration has the advantages of convenience, safety, and strong patient dependence which is an ideal route of administration. However, protein drugs are easily degraded by gastric acid and protease during oral administration resulting in low bioavailability. In this paper, a drug carrier was designed for oral administration of protein drugs, which solved the problem that protein drugs were easily inactivated in the gastrointestinal tract. Glucose oxidase nanocapsules were prepared by *in-situ* free radical polymerization on the surface of the protein using glucose oxidase as a protein drug model, and the nanocapsules were grounded into powder and encapsulated in the capsule after dried at low temperature. Hypromellose was used as a raw material to prepare hypromellose acetate succinate, which was used as an enteric coating material to coat the above-mentioned capsules to obtain enteric capsules. By simulating the environment in the gastrointestinal tract, *in vitro* release experiments and activity tests were performed. The results showed that the enteric-coated capsule did not dissolve within 2h under the environment of gastric juice, and the glucose oxidase in the capsule maintained high activity. Under the environment of intestinal juice, the enteric-coated capsule was dissolved and the activity of the glucose oxidase encapsulated by the nanocapsules was significantly higher than that of free glucose oxidase. The above experimental results proved that the drug-carrying system could solve the problem that oral protein drugs were easily decomposed by gastric acid and protease in the gastrointestinal tract and became inactivated.

Key words: Protein drugs; Oral administration; Nanocapsules; Hypromellose succinate; Protein activity