

新穎奈米微粒載體於口服蛋白質藥物傳遞上的研發

清華大學化學工程系 宋信文 湯學成

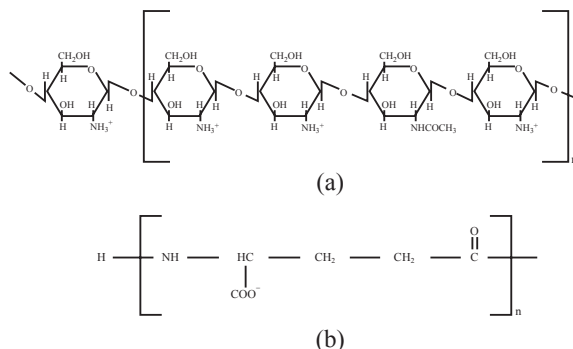
萬能科技大生物技術系 糜福龍

國家衛生研究院生物技術與藥物研究組 陳炯東

中國醫藥大學生物科技學系 林宥欣

一、前言

口服藥物為人體最常見的給藥方式，其優點在於服用方便，因此病人的接受度與配合度較高。不像注射方式，除了給藥不方便外，還會給患者帶來一定程度的畏懼及負擔。然而許多具有療效的親水性藥物如蛋白質和胜肽類藥物等，在口服給藥的過程中除了可能遭遇胃酸的破壞外，也可能無法順利通過小腸上皮細胞膜的疏水性脂雙層結構，經由腸道吸收。因此只能採取注射等方式來進行投藥。這些親水性藥物倘若想利用口服方式於腸道吸收，比較可行的途徑就是經由小腸上皮細胞與細胞間的空隙通過(paracellular pathway)。然而位於上皮細胞與細胞間的 tight junctions 為此 paracellular pathway 的主要屏障。為了增加親水性藥物在小腸的吸收能力，或可借助外力可逆性的打開上皮細胞與細胞間的 tight junctions，讓親水性藥物通過，如此還可避免蛋白質與胜肽類藥物受到細胞內酵素的破壞。根據文獻報告，幾丁聚醣(chitosan)能夠可逆性的打開細胞與細胞間的 tight junctions。因此我們利用幾丁聚醣奈米微粒載體來包覆蛋白質或胜肽類藥物，此奈米微粒載體能有效的保護被包覆的藥物，避免胃酸及胃腸道裡酵素的破壞。且能藉由幾丁聚醣能吸附於小腸上黏膜的特性，增加其滯留時間，進而打開其上皮細胞與細胞間的 tight junctions 經由 paracellular pathway，進入人體的體液及血液循環中，再釋放出所包覆藥物以達到治療上的效果。本研究團隊已成功的利用此平台技術口服傳遞胰島素，研究成果亦受到國際媒體的矚目及報導，包括了 ACS News、BBC News、Discovery News 以及德國 Focus magazine 等。

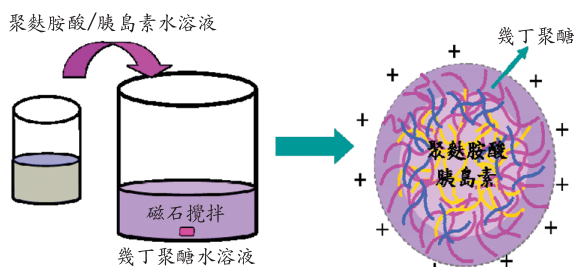


圖一 (a)幾丁聚醣與(b)聚麩胺酸化學結構式

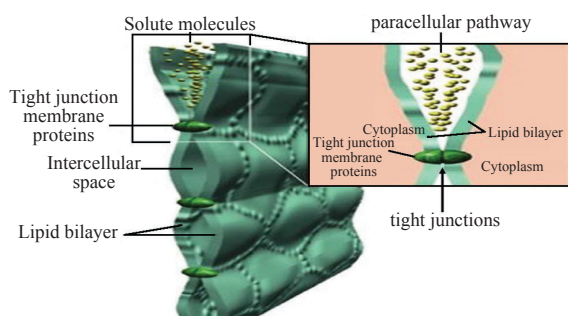
二、包覆胰島素之奈米微粒之製備

由於蛋白質或胜肽類藥物屬於較親水性的藥物，且在藥物包覆於載體的過程中，其所處的環境如溫度、pH 值與所使用的溶劑等，皆有可能影響這些藥物的活性。為了避免破壞所包覆蛋白質或胜肽類藥物的活性，且能增加藥物的包覆率，本研究擬以親水性且生物可分解的幾丁聚醣與聚麩胺酸高分子材料(圖一)來包覆胰島素。

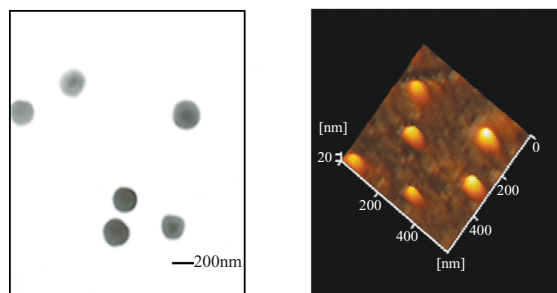
由於幾丁聚醣為帶正電性的高分子，而聚麩胺酸為帶負電性的電高分子，因此本研究擬於水相室溫的環境中，以滴入方式(dropping method)混合兩種分別帶正電(幾丁聚醣)與負電(聚麩胺酸)的高分子，在磁子攪拌下可瞬間得到經由離子鍵結所形成的奈米微粒載體，同時將胰島素包覆於其內(圖二)。這種製備方法的優點在於製備過程中不需要提高溫度也不需要使用有機溶劑，整個過程都在溫和的水相環境中進行，將有利於維持胰島素的活性[1]。同時，藉由幾丁聚醣(chitosan)能吸附於小腸上黏膜的特性[2]並可逆性的打開細胞與細胞間的 tight junctions[3]，以幫助蛋白質藥物可經由小腸上皮細胞與細胞間的空隙通過(圖三)[4]，進而再釋放出所包覆蛋白質藥物以達到治療上的效果。因此，本研究利



圖二 在室溫下水相環境中以離子鍵結方式形成奈米微粒載體包覆胰島素之示意圖



圖三 親水性藥物在小腸上皮細胞的可能吸收途徑- paracellular pathway (依[1]修改而成)

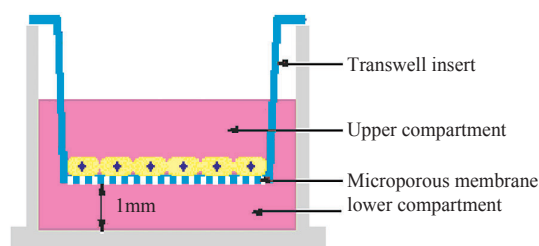


圖四 幾丁聚醣與聚麩胺酸經離子鍵結所製備出來的奈米微粒載體

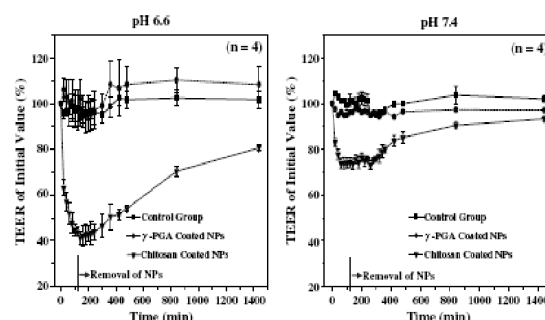
用幾丁聚醣與聚麩胺酸經離子鍵結形式所製備出來的奈米微粒載體，其尺寸大小約為 100~200 nm。如圖所示，製備出來的奈米微粒載體為大小相近的球體，且具有光滑的表面（圖四）。

三、人類結腸癌細胞(Caco-2 cells)的培養與測試

為了評估所製備出來的藥物置放奈米微粒載體，是否可以可逆性的打開細胞間的 tight junctions，我們擬以人類結腸癌細胞(Caco-2 cells) monolayers 做為體外實驗的 mode，並監測其 transepithelial electrical resistance (TEER)電阻值



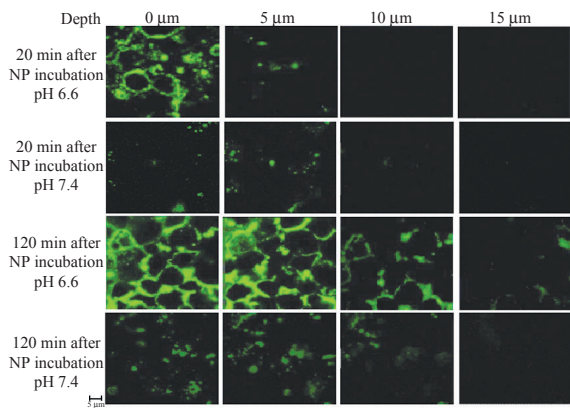
圖五、人類結腸癌細胞培養之裝置示意圖



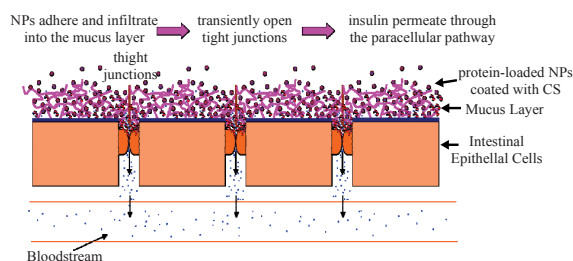
圖六 幾丁聚醣奈米微粒載體可逆性的打開 Caco-2 細胞與細胞間 tight junctions 實驗結果

變化。實驗方法謹述如下：首先，將 Caco-2 cells 培養於含 20% fetal bovine serum (FBS)、1 % nonessential amino acids (NEAA) 和 40 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin 的 MEM medium 中。接著以 trypsin-EDTA (Gibco BRL[®]) 將細胞打下，再以固定細胞數 3×10^5 轉入 transwell cell culture chamber (6 well/plate, 8 μm , growth area 4.7 cm^2 , CORNING Costar, Cambridge, MA) 內進行細胞培養（圖五）。培養條件為 37°C、5% CO_2 及 95% 空氣。細胞培養前 7 天每兩天更換其 chamber medium，7 天後每天更換 chamber medium。當 Caco-2 cell monolayers 的 TEER 電阻值達到 600 Ωcm^2 時，即可提供實驗之用[5]。

在體外實驗結果裡，已證實將製備好的奈米微粒載體加入培養有 Caco-2 細胞（模擬小腸上皮細胞）之 Transwell Chamber 上，可以可逆性的打開其細胞與細胞間的 tight junctions。使得 Transwell Chamber 之上層與下層的電阻值 (transepithelial electrical resistance, TEER) 明顯的下降，在移除 Transwell Chamber 上的奈米微粒載體後，其 TEER 值又逐漸回復（圖六）。另外以共軛焦雷射顯微鏡 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 觀察標定有 FITC 綠色螢光的幾丁聚醣奈米微粒載體，發現其的確可以打開細



圖七 標定有 FITC 綠色螢光的幾丁聚醣奈米微粒載體打開 Caco-2 細胞與細胞間 tight junctions 的 CLSM 觀察結果



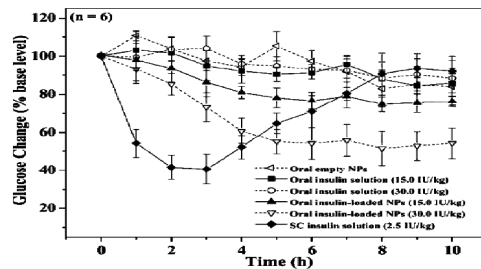
圖八 奈米微粒載體吸附在小腸黏膜上、打開上皮細胞與細胞間 tight junctions 進而釋放出藥物

胞與細胞間的 tight junctions 經由 paracellular pathway 通過 (圖七)。以上初步的研究成果,可證實本研究創新想法的可行性。

四、動物實驗

接下來研究為進行動物實驗測試,希望包覆藥物的幾丁聚醣奈米微粒載體於口服傳遞研究,希望可藉由幾丁聚醣能吸附於小腸上黏膜的特性,增加其滯留時間,進而打開其上皮細胞與細胞間的 tight junctions,進入人體的體液及血液循環中,再釋放出所包覆藥物以達到治療上的效果 (圖八)。

動物實驗程序,將依據農委會所頒佈之實驗室動物照顧與使用指南來執行。實驗裡,我們將以約 200~250g 之 male Wistar rats 做為動物模式。首先我們將 streptozotocin (STZ) 75 mg/kg 連續三天注射入老鼠腹腔形成糖尿病後[6,7],於 $t=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24$ h 取其血液,研究下列 7 組 (每組六隻) 之藥物動力學及血糖變



圖九 包覆胰島素的奈米微粒載體灌食糖尿病大鼠後的血糖變化

化: (1)灌食空奈米微粒載體; (2)灌食胰島素溶液(15.0 IU/kg); (3)灌食胰島素溶液(30.0 IU/kg); (4)灌食包覆胰島素奈米微粒載體(15.0 IU/kg); (5)灌食包覆胰島素奈米微粒載體(30.0 IU/kg); (6)皮下注射胰島素溶液(2.5 IU/kg)。

在動物實驗結果裡,已證實以奈米微粒載體包覆人體常規胰島素的效率及含量分別為 $56.8\% \pm 3.2\%$ 及 $14.9\% \pm 0.9\%$, 而包覆胰島素的奈米微粒載體維持球形且表面平滑, 其不同 pH 值的穩定度及打開細胞間的 tight junctions 的能力與未包覆胰島素的奈米微粒載體類似。將包覆胰島素的奈米微粒載體灌食糖尿病大鼠, 則發現大鼠血糖下降 (圖九)。

五、結論

利用離子鍵結方法製備幾丁聚醣奈米微粒載體, 藉由粒徑分析儀分析, 已成功製備出粒徑為 110-200 nm 奈米微粒載體。進一步將奈米微粒載體進行胰島素藥物包覆測試, 以口服方式將包覆胰島素奈米微粒載體灌食糖尿病老鼠, 可以有效地增加蛋白質藥物胰島素在小腸的吸收能力, 提升蛋白質藥物的生體可用率。

參考文獻

- [1] M. Kajihara, T. Sugie, T. Hojo, H. Maeda, A. Sano, K. Fujioka, S. Sugawara and Y. Urabe, *J. Controlled Release*, **73**, 279 (2001).
- [2] P. Artursson, T. Lindmark and S. S. Davis, *Pharm. Res.*, **11**, 1358 (1994).
- [3] M. Thanou, J. C. Verhoef and H. E. Junginger, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **50**, S91 (2001).
- [4] S. T. Ballard, J. H. Hunter and A. E. Taylor *Annu. Rev. Nutr.*, **15**, 35 (1995).
- [5] G. Borchard, H. L. Lueßen, A. G. de Boer, J.

- C. Verhoef, C. M. Lehr and H. E., *J. Control. Release*, **39**, 131 (1996).
- [6] Z. Ma, T. M. Lim and L. Y. Lim, *Int. J. Pharm.*, **293**, 271 (2005).
- [7] H. Chung, J. Kim, J. Y. Um, I. C. Kwon and S. Y. Jeong, *Diabetologia*, **45**, 448 (2002).